

**DER NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER  
METIPRANOLOL, METROPROLOL, NIFENALOL,  
OXPRENOLOL UND TOLIPROLOL  
IN DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN PRAXIS**

Astrid Riedl

---

1981

---







AUS DEM INSTITUT FÜR RECHTSMEDIZIN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand : Prof. Dr. med. W. Spann

DER NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER  
METIPRANOLOL, METOPROLOL, NIFENALOL,  
OXPRENOLOL UND TOLIPROLOL  
IN DER FORENSISCH-TOXIKOLOGISCHEN PRAXIS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin  
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Astrid Riedl

aus

München

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München



Berichterstatter : Prof. Dr. med. W. Spann

Mitberichterstatter :

Dekan : Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 29.1.1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. W. Spann, Direktor des Instituts für Rechtsmedizin, München, möchte ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeit danken.

Herrn Dr. L. v. Meyer gilt mein aufrichtiger Dank für die jederzeit freundliche Beratung und Unterstützung.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. G. Drasch und Herrn Dr. G. Kauert für ihre ständige Hilfsbereitschaft.



gewidmet

in Dankbarkeit meinen Großeltern  
Leonhard und Theresia Appel



Der Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker  
Metipranolol, Metoprolol, Nifenalol,  
Oxprenolol und Toliprolol  
in der forensisch-toxikologischen Praxis

Inhaltsverzeichnis

|        |                                                                   |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 1.     | Einleitung                                                        | 1  |
| 1.1.   | Definition, Struktur und Einteilung<br>der Beta-Rezeptorenblocker | 3  |
| 1.1.1. | Definition                                                        | 3  |
| 1.1.2. | Grundstruktur                                                     | 3  |
| 1.1.3. | Einteilung                                                        | 3  |
| 2.     | Wirkungsweise der Beta-Rezeptorenblocker                          | 5  |
| 2.1.   | Wirkungsqualitäten                                                | 5  |
| 2.2.   | Pharmakologische Wirkung<br>und therapeutische Anwendung          | 5  |
| 2.3.   | Metabolismus der Beta-Adrenolytika                                | 6  |
| 2.3.1. | Absorption                                                        | 6  |
| 2.3.2. | Bioverfügbarkeit                                                  | 8  |
| 2.3.3. | Bindung an Plasmaproteine                                         | 9  |
| 2.3.4. | Verteilung im Körper                                              | 10 |
| 2.3.5. | Eliminierung                                                      | 11 |
| 3.     | Methoden der Literatur zum Nachweis<br>der Beta-Rezeptorenblocker | 15 |
| 3.1.   | Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung                | 15 |
| 3.1.1. | Extraktion mit Lösungsmitteln                                     | 15 |
| 3.1.2. | Extraktion mit ionogenen Harzen                                   | 16 |
| 3.1.3. | Extraktion mit nicht-ionogenen Harzen                             | 17 |
| 3.2.   | Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung                    | 17 |
| 3.2.1. | Farbreaktionen                                                    | 17 |

|          |                                                                                                     |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.2.   | UV-Spektroskopie                                                                                    | 18 |
| 3.2.3.   | Spektrofluorimetrie                                                                                 | 19 |
| 3.2.4.   | IR-Spektroskopie                                                                                    | 19 |
| 3.2.5.   | NMR-Spektroskopie                                                                                   | 20 |
| 3.2.6.   | Dünnschichtchromatographie                                                                          | 20 |
| 3.2.6.1. | Anwendung der DC zum Nachweis<br>der Beta-Rezeptorenblocker                                         | 20 |
| 3.2.6.2. | Gebräuchliche Fließmittel                                                                           | 22 |
| 3.2.6.3. | Detektionsmittel                                                                                    | 23 |
| 3.2.7.   | Gaschromatographie                                                                                  | 23 |
| 3.2.7.1. | Derivatisierung                                                                                     | 28 |
| 3.2.8.   | Verschiedene Nachweismethoden                                                                       | 30 |
| 3.3.     | Ergebnis der Literaturübersicht                                                                     | 30 |
| 4.       | Eigene Untersuchungen                                                                               | 32 |
| 4.1.     | Dünnschichtchromatographie                                                                          | 32 |
| 4.2.     | Gaschromatographie                                                                                  | 35 |
| 4.2.1.   | Zur Problematik der Gaschromatographie                                                              | 35 |
| 4.2.2.   | Allgemeine gaschromatographische Arbeitsbedingungen                                                 | 41 |
| 4.2.3.   | Wahl der Packungen und Programme                                                                    | 42 |
| 4.2.4.   | Erzielte Trennungen                                                                                 | 45 |
| 4.3.     | Untersuchungen zur Derivatisierung                                                                  | 49 |
| 4.4.     | Untersuchungen zum Nachweis<br>der Beta-Blocker im biologischen Medium                              | 53 |
| 4.4.1.   | Arbeitsbedingungen                                                                                  | 56 |
| 4.4.2.   | Wahl des inneren Standards                                                                          | 56 |
| 4.4.3.   | Untersuchungen zur selektiven Extraktion<br>von Beta-Blockern aus Urin                              | 57 |
| 4.4.3.1. | Extraktion mit AMBERLITE XAD-2- Säulen                                                              | 57 |
| 4.4.3.2. | Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)                                                   | 59 |
| 4.4.4.   | Versuche zur Optimierung der Ausbeute                                                               | 61 |
| 4.5.     | Versuche zur Aufstellung der Eichgeraden                                                            | 63 |
| 4.5.1.   | Arbeitsbedingungen                                                                                  | 63 |
| 4.5.2.   | Arbeitsmethode                                                                                      | 64 |
| 4.6.     | Berechnung der Retentionsindices nach KOVATS für<br>die Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 | 66 |

|        |                                                                                                        |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.1. | Theorie und Definition<br>der Retentionsindices nach KOVATS                                            | 66 |
| 4.6.2. | Arbeitsbedingungen                                                                                     | 68 |
| 4.6.3. | Arbeitsmethode                                                                                         | 69 |
| 4.7.   | Identifizierung und quantitativer Nachweis von<br>Metoprolol anhand eines authentischen Patientenurins | 71 |
| 4.7.1. | Arbeitsbedingungen                                                                                     | 71 |
| 4.7.2. | Arbeitsmethode                                                                                         | 71 |
| 4.7.3. | Nachweisgrenzen                                                                                        | 73 |
| 4.8.   | Arbeitsvorschriften                                                                                    | 74 |
| 5.     | Diskussion                                                                                             | 77 |
| 6.     | Zusammenfassung                                                                                        | 79 |
| 7.     | Literaturverzeichnis                                                                                   | 81 |



## 1. EINLEITUNG

Die gezielte Beeinflussung der Sympathikuswirkung durch Beta-Rezeptorenblocker zählt zu den wichtigsten arzneitherapeutischen Fortschritten der letzten Jahre (17).

Die Entwicklung dieser Pharmaka wurde erst möglich, nachdem AHLQUIST (3,4,5) im Jahre 1948 die erregende und hemmende Wirkungsweise der Katecholamine untersucht hatte und die Existenz zweier Arten von Rezeptoren des sympathischen Nervensystems vermutete: Die Alpha-Rezeptoren, auf die Noradrenalin bevorzugt einwirkt und deren Blockade mit den Alpha-Sympathikolytika gelingt, und die Betarezeptoren, die sich bevorzugt durch Isoproterenol stimulieren lassen und die bis dahin nicht blockiert werden konnten (63). Die Richtigkeit der AHLQUISTschen Hypothese konnte in hervorragender Weise bestätigt werden, als MILLS (62) im Jahre 1958 durch Austausch der beiden Hydroxylgruppen des Isoproterenol gegen zwei Chloratome die Synthese des ersten Beta-Sympathikolytikums Dichlorisoproterenol ( $\text{DCI}^{\text{R}}$ ) gelang. Diese Substanz erlangte aber wegen verschiedener Nebenwirkungen keine therapeutische Bedeutung. POWELL und SLATER (86) konnten mit Hilfe dieser Substanz eine spezifische Blockade der Beta-Rezeptoren demonstrieren. Ihre Ergebnisse wurden später von MORAN und PERKINS (77) bestätigt. Ausgehend vom  $\text{DCI}^{\text{R}}$  fand STEPHENSON (49) im Pronetalol einen neuen Beta-Blocker, indem er die beiden Chloratome durch einen weiteren Ring ersetzte. Da sich dieser Stoff im Tierversuch jedoch als kanzerogen erwies (7,82), konnte er nicht in die Therapie eingeführt werden.

In den darauffolgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Beta-Blocker entwickelt, die sich in der Stärke der Blockierung, der Organspezifität, den Begleitwirkungen und der sympathikomimetischen Eigenwirkung wesentlich voneinander unterscheiden und somit zu einer starken Verbreiterung des Indikationsspektrums dieser Pharmaka beitrugen.

Beta-Rezeptorenblocker finden zur Prophylaxe von Angina pectoris und Behandlung von Hypertonie in zunehmendem Maße Verwendung (39). Bei der Hypertonithherapie werden sie häufig mit Saluretika und den kompatiblen Antihypertensiva kombiniert.

Als Nebenwirkungen können bereits bei therapeutischer Dosierung Müdigkeit, Schwindel und, besonders in Verbindung mit Alkohol, ver-

minderte Reaktionsfähigkeit auftreten (9,45,104,105). In der Verkehrsmedizin sind zahlreiche Fälle bekannt, in denen die Einnahme von Beta-Rezeptorenblockern als Grund für Fehlverhalten genannt wird (21,104).

Aus dem toxikologischen Fachbereich liegen Berichte darüber vor, daß derartige Substanzen auch zu Suiciden verwendet werden (32,40). Bei Überdosierung kann die blockierende Wirkung auf das Reizleitungssystem zu lebensbedrohlicher Bradykardie und totalem Herzblock führen (46). Um die Einnahme überprüfen bzw. eine Todesursache infolge Vergiftung klären zu können, ist der Nachweis dieser Arzneimittel in biologischem Material von großer Bedeutung. Dabei genügt es in der heutigen gerichtsmedizinischen Laborpraxis nicht mehr, mit den bisher in der Literatur vorgestellten Methoden zu arbeiten, die in der Regel nur für die Analyse einer einzigen Substanz vorgesehen sind. Deshalb ist es notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem der Nachweis eines Spektrums von mehreren Beta-Rezeptorenblockern ermöglicht wird.

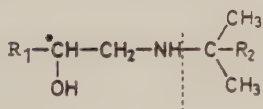
## 1.1. Definition, Struktur und Einteilung der Beta-Rezeptorenblocker

### 1.1.1. Definition

Beta-Rezeptorenblocker sind Verbindungen, welche die Wirkung von Sympathikomimetika an adrenergen Beta-Rezeptoren durch kompetitiven Antagonismus aufzuheben oder zu reduzieren vermögen (39). Sie gehören der Stoffklasse der Alkohole an, besitzen zum Großteil Ätherstruktur und sind bereits in relativ geringen Konzentrationen an isolierten Organen und im Gesamtorganismus wirksam.

### 1.1.2. Grundstruktur

Die chemische Grundstruktur der Beta-Rezeptorenblocker leitet sich in der Regel vom Isoproterenol ab (11) und entspricht der allgemeinen Formel eines N-alkylierten Äthanol- bzw. Propanolamin mit asymmetrischem Kohlenstoffatom und einem aromatischen Rest (39) :



R<sub>1</sub> : Phenoxy-Methyl-  
Phenyl-  
Aryl-

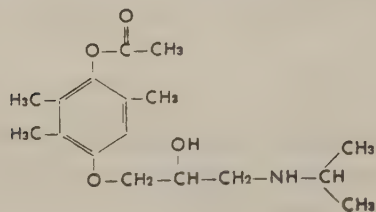
R<sub>2</sub> : H (Isopropyl-)  
CH<sub>3</sub> (Isobutyl-)

\* C : asymmetrischer  
Kohlenstoff

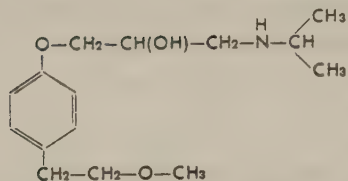
### 1.1.3. Einteilung

Beta-Rezeptorenblocker lassen sich in Aryläther von Propanolaminen und Aminoäthanol-derivate einteilen (98). Die in dieser Arbeit behandelten Substanzen werden in der folgenden Aufstellung den beiden Gruppen zugeordnet. Die Formeln und Bezeichnungen entstammen der PHARMAZEUTISCHEN STOFFLISTE (85):

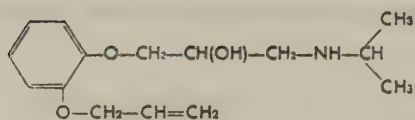
# Aryläther von Propanolaminen



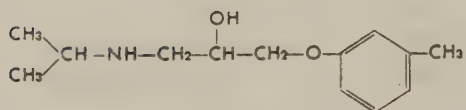
Metipranolol (INNv)



Metoprolol (INN)

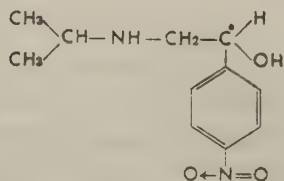


Oxiprenolol (INN)



Toliprolol (INN)

## Aminoäthanolderivate



Nifenalol (INN)

## 2. WIRKUNGSWEISE DER BETA-REZEPTORENBLOCKER

### 2.1. Wirkungsqualitäten

Die verschiedenen Substituenten am aromatischen System der Beta-Blocker Grundstruktur bestimmen weitgehend die Ausprägung der Wirkungsqualitäten.

Verschiedene Beta-Adrenolytika sind in der Lage, auf die Rezeptoren gleichzeitig hemmend und erregend zu wirken. Diese agonistische sympathikomimetische Eigenwirkung ist jedoch bei hohen Konzentrationen und therapeutischer Dosierung kaum von Bedeutung. Deshalb unterscheidet man hauptsächlich die bekannten spezifischen beta-sympathikolytischen Hauptwirkungen von den unspezifischen Begleit- oder Membranwirkungen (9). Letztere äußern sich als chinidinartige kardiodepressive Effekte auf das Reizleitungssystem und die Kontraktilität des Herzens (14) und als papaverinartige Spasmolyse der glatten Muskulatur (46). Sie sind unabhängig von der sterischen Konfiguration der Seitenkette, während die sympathikolytischen Hauptwirkungen an die D-Enantiomere gebunden sind (34,47).

Spezifische Effekte sind am Herzen Hemmung der Chronotropie, Dromotropie und Inotropie, an der Lunge Bronchokonstriktion und in der Peripherie eine Erhöhung des Gefäßwiderstands durch Überwiegen der alpha-sympathikomimetischen Vasokonstriktion. Dabei unterscheidet man Herz- und Stoffwechsel- (Beta-I) sowie Bronchial- und Gefäßrezeptoren (Beta-II) (50,64).

### 2.2. Pharmakologische Wirkung und therapeutische Anwendung

Beta-Blocker schützen das kardiovaskuläre System gegen übermäßige adrenerge Reize und somit gegen die Auswirkungen von umweltbedingtem bzw. emotionellem Streß, indem sie die Stimulation der Beta-Rezeptoren selektiv und reversibel dämpfen (105). Das Herz arbeitet infolgedessen ruhiger und ökonomischer, der myokardiale Sauerstoffverbrauch wird herabgesetzt, was sich besonders bei der Prophylaxe von Angina pectoris günstig auswirkt. Die Beta-Adreno-

lytika reduzieren die "beta-sympathikomimetisch ausgelöste Steigerung der Schlagfrequenz und Kontraktilität des Herzmuskels auf den ihm zugrundeliegenden sauerstoffsparenden FRANK-STARLING-Mechanismus" (39). Auf diese Weise wird das Mißverhältnis zwischen arterieller Blutversorgung und Sauerstoffbedarf korrigiert, das allen Formen von koronaren Durchblutungsstörungen zugrundeliegt. Günstige Folgen sind eine Erhöhung der Belastungstoleranz und ein vermindertes Angina pectoris Risiko. Da Beta-Blocker auch die Pulsfrequenz und Erregbarkeit des Herzmuskels herabsetzen, eignen sie sich schließlich zur Beseitigung von Tachykardien und Regularisierung gewisser Formen der Arrhythmie (9).

### 2.3. Metabolismus der Beta-Adrenolytika

Literatur über die Pharmakokinetik und den Metabolismus der Beta-Sympathikolytika war nur für die Substanzen Metoprolol, Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol zugänglich, während für das Metipranolol keine Veröffentlichungen zur Verfügung standen. Die Ergebnisse dieser Studien sind aufgrund der Tatsache, daß sie teilweise bei nicht-therapeutischer Dosierung mit unspezifischen Methoden und häufig nur im Tierexperiment erzielt wurden, nur unter Vorbehalten miteinander vergleichbar.

JOHNSSON und REGÅRDH (54) sowie PFEIFFER und ZIMMER (84) beschreiben in ihren Übersichtsarbeiten den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse über Biotransformation, klinische Pharmakokinetik und Distribution der Beta-Blocker Metoprolol, Oxprenolol und Toliprolol.

#### 2.3.1. Absorption

Die Autoren beschreiben in der Regel eine rasche und nahezu vollständige Absorption der Beta-Blocker im Gastrointestinaltrakt. Die Aufnahme wird begünstigt durch die ionisierte, wasserlösliche Form, in der diese Substanzen im sauren bzw. schwach alkalischen Milieu des Verdauungstrakts vorliegen und die auf den  $pK_a$ -Wert von 9,5-9,7 der sekundären Aminogruppe der Seitenkette zurückzuführen ist.

BORG et al. (20) und REGÅRDH et al. (89) geben für das Metoprolol eine Absorption von über 95% der peroral verabreichten Dosis bei verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen an. Durch Untersuchungen mit radioaktiv markierter Substanz bewies REGÅRDH (88), daß die Aufnahme dieses Beta-Blockers im gesamten Verdauungstrakt stattfindet, wobei die verschiedenen pH-Werte der einzelnen Gastrointestinalflüssigkeiten die Absorptionsrate beeinflussen. In seinen Studien über die pH-abhängige buccale Resorption beobachtete er eine rasche Aufnahme des Metoprolol im schwach alkalischen Milieu, die unter pH 4 zum Stillstand kommt.

MARTIN und WIEGAND (67) sowie SCHRAVEN et al. (96) berichten über eine 50%ige Absorption von peroral verabreichten Dosen von Nifedipin im Magen-Darm-Trakt, was durch die von MÖLLMANN et al. (73) erstellten Ganztierradiogramme über die Verteilung von  $C_{14}$ -markiertem Nifedipin in den Organen von Ratten bestätigt werden konnte.

RIESS et al. (93) stellen in ihren Untersuchungen mit tritiummarkiertem Oxprenolol nach oraler Applikation eine Absorption von 70-95% der Dosis fest. KENDALL et al. (58) fanden in ihrer Studie über Faktoren, die die Absorption von Oxprenolol beeinflussen, daß darmmotilitäts erhöhende Stoffe wie Metoclopramid bei diesem Beta-Blocker wider Erwarten keine Steigerung der Absorption bedingen. Ebenso bleiben strukturelle Veränderungen der Gastrointestinalschleimhaut, wie sie bei Magen-Darm-Erkrankungen bestehen oder beim Gesunden durch Neomycin hervorgerufen werden können, ohne Auswirkung auf die Resorption dieses Beta-Blockers. Ferner postulieren die genannten Autoren einen weitgehenden Metabolismus des Oxprenolol bereits während der Absorption in der Darmmucosa. BRUNNER et al. (23) sowie JOHNSON et al. (55) ermitteln für Metoprolol und Oxprenolol relativ kurze Zeiten von 0,5-1,5 Stunden für das Erreichen von Spitzenkonzentrationen im Plasma und führen dies auf eine rasche Aufnahme im Gastrointestinaltrakt zurück.

ARNDTS und POLLMANN (8) untersuchen mit Hilfe der Flüssigkeits-szintigraphie den Metabolismus von radioaktiv markiertem Toliprolol bei Mensch, Hund und Ratte und stellen bei allen drei Spezies eine gastrointestinale Absorption von 90-100% der Dosis fest, wobei die Aufnahme bei der Ratte innerhalb von 30, beim Hund von 80 und beim Menschen von 120 Minuten erfolgt.

Bei sämtlichen pharmakokinetischen Studien, die für die vorliegende Arbeit zugänglich waren, bleibt der Effekt von Speisen und verschiedenen pharmakologischen Darreichungsformen auf die Absorptionsrate unberücksichtigt, was die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse bedeutend einschränkt. Die einzige Ausnahme bilden REGÅRDH et al. (89), die den Metabolismus von Metoprolol an nüchternen Probanden studieren, nachdem sie den Wirkstoff peroral als schwach saure Lösung appliziert hatten.

Schließlich weisen JOHNSSON und REGÅRDH (54) auf die Möglichkeit einer verminderten Absorption von Beta-Blockern im fortgeschrittenen Alter und bei Nierenerkrankungen hin.

### 2.3.2. Bioverfügbarkeit

Erst in den letzten Jahren hatte man entdeckt, daß nicht derjenige Anteil der Dosis, der im Magen-Darm-Trakt absorbiert wird, die Intensität des pharmakologischen Effekts bestimmt, sondern die Fraktion, die letztlich im System verfügbar ist. Dieses Erkenntnis führte zu dem Konzept der Bioverfügbarkeit (118), die definiert ist sowohl als Maß für die relative Menge einer verabreichten Dosis, die die allgemeine Zirkulation erreicht, als auch deren Anflutungsgeschwindigkeit. Da Beta-Blocker vornehmlich zur Behandlung chronischer Krankheiten verwendet und damit ständig appliziert werden, ist hier die Größe der Bioverfügbarkeit von dominierendem Interesse. Sie variiert sehr stark zwischen den einzelnen Beta-Blockern und scheint abzuhängen von der Extraktionsrate der Leber, die nach GIBALDI et al. (41) durch den hepatischen Blutfluß und die Clearance der jeweiligen Substanz durch dieses Organ bestimmt wird. Demnach hat eine hohe hepatische Clearance eine niedrige systemische Verfügbarkeit zur Folge.

MASON und WINER (68) sowie JOHNSSON et al. (55) stellen für das Oxprenolol bzw. Metoprolol große Unterschiede in der Bioverfügbarkeit zwischen oral und intravenös applizierter Substanz fest. So zeigt sie bei Oxprenolol eine interindividuelle Schwankungsbreite von 19-74% der oralen Dosis, während sie beim einzelnen Probanden relativ konstant ist. SHAND (97) beschreibt eine fünffach höhere interindividuelle Schwankung der oralen im Vergleich zur intrave-

nösen Bioverfügbarkeit dieses Beta-Blockers. Er führt dies – neben genetischen und umweltbedingten Einflüssen – vor allem auf die hohe hepatische Clearance dieses Wirkstoffs zurück. KENDALL et al. (58) berichten, daß weniger als 30% der oral verabreichten Dosis von Oxprenolol – trotz guter Resorption – den großen Kreislauf erreichen. Sie begründen dies einerseits mit Biotransformation durch Verdauung oder bakterielle Zersetzung bereits in der Magen-Darm-Mucosa, andererseits mit weitgehender Glucuronisierung der Substanz in der Leber während des sog. 'first-pass'. Der Nachteil eines derart ausgeprägten 'first-pass'-Effekts liegt nach MEIER (70) nicht nur in einer geringeren Bioverfügbarkeit, die durch höhere Dosierung kompensiert werden kann, sondern auch in der daraus resultierenden interindividuellen Variation der Plasmaspiegel, was die Dosierung und den Nachweis solcher Substanzen erschwert. JACK und IMHOF (51) geben die Bioverfügbarkeit von Oxprenolol als Integral der Plasmakonzentration/Zeit -Funktion nach oralen Einzeldosen von 40, 80 und 160mg TRASICOR<sup>R</sup> an. Im Gegensatz zu den meisten anderen Beta-Blockern ist die Bioverfügbarkeit des Oxprenolol unter therapeutischen Bedingungen kaum von der Dosis abhängig (1).

REGÅRDH et al. (89,90) vergleichen die Bioverfügbarkeit des Metoprolol nach oralen Einzeldosen und Dauermedikation und berichten eine 'first-pass'-Elimination von 50-60% der Dosis.

### 2.3.3. Bindung an Plasmaproteine

In der Literatur liegen nur wenige Studien über Plasmaproteinbindung von Beta-Blockern vor. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die einzelnen Substanzen ein sehr verschiedenes Ausmaß an Plasmaeiweißbindung, das nach KOCH-WESER und SELLERS (59) direkten Einfluß auf die Verteilungs- und Eliminationskinetik eines Pharmakons ausübt. Zudem zeigen die einzelnen Substanzen Charakteristika hinsichtlich der Beteiligung der verschiedenen Proteinfractionen am Transport.

So ist das Metoprolol beim Menschen ausschließlich an Serumalbumin gebunden (53,54). Da dies jedoch nur 10% der im Blut vorhandenen Menge betrifft, während 90% des Metoprolol in freier Form

vorliegen, ist der Einfluß der Plasmaproteinbindung auf die Eliminationsrate in diesem Fall nur unbedeutend. REGÅRDH et al. (89) berichten eine bei therapeutischer Dosierung stets um 20% höhere Konzentration des Metoprolol im Erythrocyten als im Plasma.

#### 2.3.4. Verteilung im Körper

Im allgemeinen wird eine Substanz, die den großen Kreislauf erreicht, von verschiedenen Körpergeweben gebunden. Geschwindigkeit und Ausmaß dieser Bindung sind in der Regel direkt proportional zum regionalen Blutfluß und der Lipidlöslichkeit der Substanzen (42) und indirekt proportional zum Umfang ihrer Plasmaproteinbindung (37). JOHNSON und REGÅRDH (54) beschreiben für die meisten Beta-Blocker relativ kurze Verteilungshalbwertszeiten zwischen 5 und 30 Minuten. Die Distributionsvolumina der einzelnen Substanzen variieren um das drei- bis vierfache, wobei in allen Fällen der intravasale Raum bei weitem übertroffen wird.

Nach Angaben von REGÅRDH et al. (89) und BORG et al. (20) besitzt das Metoprolol mit 5,2 l/kg das größte Verteilungsvolumen aller diesbezüglich untersuchten Beta-Blocker. Die Ursache dafür dürfte in der äußerst geringen Plasmaproteinbindung dieser Substanz liegen. BODIN et al. (18) ermitteln bei Maus und Ratte eine Äquilibrierung des lipophilen Metoprolol zwischen Gehirn und Plasma im Konzentrationsverhältnis 3:1 während der ersten 30 Minuten nach intravenöser Applikation.

Nach Untersuchungen von MÖLLMANN et al. (74,75) in Ergänzung der Verteilungsstudien von SCHRAVEN et al. (95) zeigt radioaktiv markiertes Nifenalol im Rattenorganismus nach intravenöser Applikation ein charakteristisches Verteilungsmuster mit auffälliger Anreicherung der Radioaktivität zuerst in Leber, Niere, Herz und Gehirn, dann in den Speicheldrüsen und der Chorioidea des Auges und schließlich – nach etwa 2-3 Stunden – in Pharynx und Oesophagus. Langzeitversuche bei therapeutischer Dosierung sowohl per os als auch intraperitoneal zur Feststellung nachteiliger organspezifischer Akkumulation des Nifenalol ergaben eine besonders starke Anreicherung in Dünndarm, Leber, Niere und Harnblase, während Herz, Lunge und Speicheldrüsen nur geringfügige Spuren von Radioaktivität

tät zeigten. Aufgrund von Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der Radioaktivitätsspiegel in den Organen und von  $^{14}\text{C}$ -Bestimmungen im Urin konnte jedoch eine Akkumulation dieses Beta-Blockers ausgeschlossen werden. Außerdem zeigt sich bei derartigen Langzeitmedikationen eine Steigerung der Radioaktivitätsspitzenwerte in einigen Organen bis auf das Doppelte gegenüber akut behandelten Tieren. MÖLLMANN et al. (73) erklären diesen Effekt mit einer langfristig erhöhten Membranpermeabilität. Ferner berichten diese Autoren, daß sich nach p.o. und i.p. im Gegensatz zur i.v. Verabreichung im ZNS nur sehr geringe Radioaktivitätsmengen nachweisen lassen, die außerdem innerhalb des Gehirns ein anderes Verteilungsmuster aufweisen.

Die Firmen BOEHRINGER SOHN (19) und GIULINI PHARMA (43) berichten für das Toliprolol eine sehr hohe Konzentration im Lungengewebe, eine deutlich geringere Anreicherung in Herz, Niere, Gehirn und Milz, während in der Leber nur Spuren des Beta-Blockers zu finden sind.

Der Einfluß von Lebererkrankungen auf die Verteilung von Beta-Blockern im Körper wurde bisher noch nicht untersucht. SHAND (97) vermutet jedoch bei Substanzen mit hoher hepatischer Clearance wie Metoprolol und Oxprenolol unter diesen Umständen infolge der Reduktion des hepatischen Blutflusses und der Enzymaktivität sowie verminderter Proteinbindung eine Herabsetzung der Leberclearance und Erhöhung der Eliminationshalbwertszeit.

### 2.3.5. Eliminierung

Die Literatur beschreibt eine rasche und nahezu vollständige Ausscheidung sämtlicher handelsüblicher Beta-Blocker bei mittleren Eliminationshalbwertszeiten von 2-4 Stunden, die in der Regel unabhängig vom Applikationsmodus sind. Schlechte Leber- und Nierenfunktion können die Eliminationsrate derjenigen Beta-Blocker beträchtlich beeinflussen, die durch das insuffiziente Organ ausgeschieden werden. Auch pH-Schwankungen des Urins verändern das Ausmaß der renalen Elimination besonders von lipophilen Substanzen wie Metoprolol, Nifenalol und Oxprenolol (88). Abhängig von der Fettlöslichkeit der einzelnen Stoffe sind Leber und Niere in unter-

schiedlichem Umfang an deren Ausscheidung beteiligt. Hohe Lipophilie bedingt somit eine beinahe vollständige Elimination durch Metabolisierungssysteme in der Leber. Je stärker andererseits die Fettlöslichkeit abnimmt, desto mehr steht die renale Ausscheidung im Vordergrund. Bei den meisten Beta-Blockern spielen beide Systeme eine Rolle, wie das Verhältnis von unveränderter Reinsubstanz zu Metaboliten im Urin zeigt.

Obwohl Anzahl und relative Menge der Metaboliten einzelner Beta-Blocker stark variieren, können einige gemeinsame Stoffwechselwege beschrieben werden. Die oxidative Desaminierung und O-Desalkylierung mit anschließender Seitenkettenoxidation sind zwei Reaktionsmechanismen, an denen sämtliche Beta-Blocker beteiligt zu sein scheinen. Ebenso werden die aromatische und aliphatische Hydroxylierung sowie die Konjugatbildung zwischen der sekundären Alkoholgruppe der Seitenkette und Glucuronsäure für eine große Anzahl dieser Wirkstoffe beschrieben (54).

REGÅRDH et al. (89) und BORG et al. (20) teilen mit, daß Metoprolol vorwiegend in metabolisierter Form ausgeschieden wird. Mit Hilfe der Tritiummarkierung identifizieren die zuletzt genannten Autoren die drei Hauptmetaboliten des Metoprolol im menschlichen Urin, die zusammen mit 85% der eliminierten Radioaktivität angegeben werden. Bei Hund und Ratte sind diese drei Stoffwechselprodukte ebenfalls im Harn nachweisbar, zeigen jedoch ein anderes Verteilungsmuster. Die Hydroxylierung der Methoxyäthylgruppe scheint ein bevorzugter Abbauweg der Ratte zu sein. Ansonsten fanden sich bei Hund und Ratte eine Vielzahl kleinerer Metaboliten, die beim Menschen nicht vorkommen. Eine fast vollständige, ausschließlich renale Eliminierung der Radioaktivität innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verabreichung des Wirkstoffs berichten diese Autoren bei Mensch und Hund, während sie bei der Ratte eine faekale Ausscheidung von etwa 10-20% der Dosis feststellen konnten. Die Ausscheidungsrate von Metoprolol über die Nieren ist nach REGÅRDH (88) direkt proportional zu seiner Plasmakonzentration. Diese Beziehung dürfte auch für andere Beta-Blocker zutreffen. REGÅRDH et al. (89) fanden einen Wert von 110 ml/min für die renale Clearance dieses Beta-Blockers. Dies entspricht in etwa der Kreatinin-Clearance gesunder Probanden und bedeutet, daß Metoprolol hauptsächlich über die Nieren durch glomeruläre Filtration ausgeschieden wird.

Tabelle 1 : Zusammenfassung der charakteristischen pharmakokinetischen Daten  
der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Beta-Rezeptorenblocker

| INN                    | Absorption<br>T <sub>max</sub><br>(h) | Biover-<br>fügbar.<br>(%d.Dos.) | 'first-<br>pass'<br>(%d.Dos.) | Distrib.-<br>volumen<br>(l/kg) | Elim.<br>t <sub>1/2</sub><br>(h) | Tot.Elim.<br>im Urin<br>(%d.Dos.)* | Reinsub.<br>im Urin<br>(%d.Dos.) | Literatur                         |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Metipranolol<br>(INNv) | -                                     | -                               | -                             | -                              | -                                | -                                  | -                                | -                                 |
| Metoprolol             | 0,5-1,5                               | 95                              | 50                            | 52                             | 3-4                              | 95                                 | 3                                | (1, 18, 53, 55,<br>88, 89)        |
| Nifenalol**            | -                                     | 50                              | -                             | -                              | -                                | 25                                 | -                                | (67, 73, 74,<br>75, 95, 96)       |
| Oxprenolol             | 0,5-1,0                               | 70-95                           | 24-60                         | 12                             | 4,5 (1-2)                        | 70-95                              | 2-5                              | (18, 52, 58, 68,<br>88, 93), (23) |
| Toliprolol             | -                                     | 90-95                           | -                             | -                              | -                                | 95                                 | 5                                | (8, 19, 43)                       |

\* Es wurden Reinsubstanz und Metaboliten zusammen berücksichtigt

\*\* Die angegebenen Werte entstammen ausschließlich Versuchen an der Ratte

BORG et al. (20) berichten, daß nach i.v. Injektion etwa 8% der Dosis von Metoprolol als Reinsubstanz im Urin erscheinen, die sich nach p.o. Gabe auf 3% reduzieren. Die Eliminationshalbwertszeiten der Metaboliten dieses Beta-Blockers von 3-4 Stunden bei oraler Applikation stimmen nach REGÅRDH et al. (89) mit denen der Muttersubstanz überein, während sie nach i.v. Verabreichung auf 5 Stunden erhöht sind. Dies sei ein Hinweis darauf, daß der Applikationsweg den Stoffwechsel der Muttersubstanz beeinflussen kann. Eine Abhängigkeit der Eliminationshalbwertszeit von der Dosis konnte beim Metoprolol nicht festgestellt werden (55). REGÅRDH et al. (90) fanden, daß durch Zufuhr des Metoprolol in der Retardform weder die Menge an unveränderter Reinsubstanz im Urin (ca. 3%), noch die Größe der renal ausgeschiedenen Fraktion (95-97% der Dosis) wesentlich verändert wird.

BORG et al. (20) konnten bei zwei Metoprolol-Metaboliten pharmakologische Potenz feststellen, die sich im Vergleich zur Muttersubstanz jedoch 2-8mal geringer erwies.

MÖLLMANN et al. (73) untersuchten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Nifenalol 24 Stunden nach p.o. Applikation einer Dosis von 50mg/kg die renale und faekale Radioaktivitätsausscheidung bei der Ratte und fanden eine dreifach höhere Elimination über die Faeces als durch die Nieren.

SHAND (97) schließt von der großen Differenz zwischen totaler und renaler Clearance des Oxprenolol auf eine hohe Metabolisierungsrate dieser Substanz in der Leber. KENDALL et al. (58) geben für diesen Beta-Blocker eine Eliminationshalbwertszeit von 4,5 Stunden an, wobei MASON und WINER (68) Unabhängigkeit von Applikationsweg und Dosis ermitteln konnten. RIESS et al. (93) untersuchten den Metabolismus des Oxprenolol bei Mensch, Hund, Maus und Ratte mit Hilfe der Radiotracer-Technik und Gaschromatographie und identifizierten als Hauptmetaboliten das Glucuronsäurekonjugat dieses Beta-Blockers. In einer anderen Studie weisen RIESS et al. (92) fünf weitere Metaboliten von tritiummarkiertem Oxprenolol im Urin nach. Ferner messen sie eine Ausscheidung von 70-95% der zugeführten Radioaktivität innerhalb von 48 Stunden.

ARNDTs und POLLMANN (8) ermitteln für das Toliprolol bei Mensch und Hund eine ausschließlich renale Elimination, während bei der Ratte etwa 10-20% der verabreichten Dosis in den Faeces erschei-

nen. Die ausgeschiedenen Metaboliten dieses Beta-Blockers konnten bei diesen Spezies als Methylphenoxymilchsäure (31%), Para-Hydroxyoxprenolol (20%) und Konjugate (50%) identifiziert werden. Während der Mensch ausschließlich Glucuronide bildet, finden sich beim Hund zu 50% Schwefelsäurekonjugate. Die Hydroxyverbindung ist nur innerhalb der ersten Stunde nach Applikation im Urin nachweisbar, was auf eine äußerst rasche Eliminierung dieses Metaboliten hindeutet. Die Firma GIULINI PHARMA (43) berichtet eine Reinsubstanzausscheidung des Toliprolol im Harn von nur 5% der Dosis. Der Abbau erfolge in der Leber durch ein mikrosomales Enzymsystem. Tabelle 1 enthält die wichtigsten pharmakokinetischen Daten.

### 3.           METHODEN DER LITERATUR ZUM NACHWEIS DER BETA-REZEPTORENBLOCKER

#### 3.1.       Verfahren zur Gruppentrennung und zur Anreicherung

##### 3.1.1.   Extraktion mit Lösungsmitteln

Allen Beta-Blockern ist ein alkaloidähnlicher basischer Charakter gemeinsam, weswegen sie mit lipophilen Lösungsmitteln aus alkalischem Medium ausgeschüttelt werden können.

In der Literatur werden meistens Äther zur Extraktion benutzt. STANKE (98) verwendet zur Isolierung von Oxprenolol und Toliprolol aus pharmazeutischen Zubereitungen die Extraktion mit Diäthyläther aus natronalkalischem Milieu. Zur Gewinnung von Toliprolol aus Doberol<sup>R</sup> muß jedoch zuerst das Hydrochlorid durch Ausschüteln mit Wasser von der Trägermasse getrennt werden.

BORG et al. (20) extrahieren einen sauren Metaboliten des Metoprolol aus azidifiziertem Rattenurin bei pH 2 ebenfalls mit Diäthyläther. Nach anschließendem Abdampfen der Ätherphase wird der Rückstand in 0,05M Phosphatpuffer von pH 6 gelöst und erneut in der angegebenen Weise ausgeschüttelt. QUAGLIO und CAVICCHI (87) extra-

hieren den Beta-Blocker Nifenalol aus Plasma von pH 8 mit Äthyläther.

Zur Erhöhung der Ausbeuten und Verbesserung der Reinheit der Extrakte werden neben dem üblichen Äther auch andere lipophile Lösungsmittel verwendet. So erreicht ERVIK (36) eine hohe Extraktionskapazität, indem er Metoprolol aus natronalkalischem Plasma bzw. Urin mit Benzol ausschüttelt. Um die Bildung einer ungünstigen Emulsion des Plasmas zu verhindern, empfiehlt er, vorher die wässrige Phase mit Natriumchlorid zu sättigen. Außerdem bedinge Natriumchlorid eine geringfügig erhöhte Ausbeute an Metoprolol.

MASON und WINER (68) modifizieren die Methode von ERVIK für das Oxprenolol, indem sie Plasma vor der eigentlichen Extraktion mit 5n Phosphorsäure auf pH 3 ansäuern und dann mit Benzol ausschütteln. JACK und RIESS (52) verwenden zur Isolierung von Oxprenolol aus Plasma ebenfalls die Methode von ERVIK, schütteln jedoch – der besseren Ausbeute wegen – mit einem Methylenchlorid/Äthyläther-Gemisch im Verhältnis 1:4 aus. Nach dem Zentrifugieren wird der organische Extrakt mit 0,1n Schwefelsäure ausgeschüttelt und die lipophile Phase abgetrennt. Daraufhin wird die saure Phase alkalisiert und nochmals mit der Methylenchlorid/Äther-Mischung bei pH 10,5 ausgeschüttelt.

Äthylacetat verwendet WALLE (109) zur Extraktion von Oxprenolol und vier seiner Metaboliten aus Rattenurin nach Alkalisieren mit 5n Natriumhydroxid auf pH 10 und empfiehlt diese Methode zur Gewinnung sämtlicher Beta-Blocker und vieler ihrer Metaboliten aus Körperflüssigkeiten und Geweben.

### 3.1.2. Extraktion mit ionogenen Harzen

Die Extraktion mit ionogenen Harzen beruht auf einer Adsorption von Substanzen gleicher Ladung am Trägerharz entgegengesetzter Ladung und ihrer anschließenden Elution bei verschiedenen pH-Werten. ARNDTS und POLLMANN (8) bringen zur Isolierung des Para-Hydroxy-Metaboliten von Toliprolol Urinproben auf eine mit saurem Puffer von pH 5,9 beladene AMBERLITE CG 50-2 -Säule und eluieren mit Wasser und ansteigenden Konzentrationen von Ameisensäure.

### 3.1.3. Extraktion mit nicht-ionogenen Harzen

Im Anschluß an ihre Ionenaustauschchromatographie mit AMBERLITE CG 50-2 eluieren ARNDTS und POLLMANN (8) den Milchsäuremetaboliten des Toliprolol aus dem Ätherextrakt der wässrigen Fraktion mit dem nicht-ionogenen AMBERLITE XAD-2- Harz und abwechselndem Auswaschen mit gleichen Mengen an Wasser und Äthanol.

BORG et al. (20) bringen zur Isolierung zweier saurer und eines basischen Metaboliten des Metoprolol Urin auf das Polystyrolharz SERVACHROM XAD-2 ,das in Glassäulen 10x200 mm gepackt ist.Eluiert wird auch hier abwechselnd mit Wasser und Äthanol.Um den Milchsäuremetaboliten dieses Beta-Blockers isolieren zu können,lösen sie den aus Rattenurin gewonnenen Ätherextrakt in Phosphatpuffer von pH 6,geben ihn auf die SERVACHROM XAD-2- Säule und eluieren in der gleichen Weise.

RIESS et al. (92) verwenden bei ihren Untersuchungen der Oxprenolol-Metaboliten ebenfalls das SERVACHROM XAD-2 ,jedoch Säulen der Dimension 70x450 mm.Sie eluieren fünf tritiummarkierte Metaboliten dieses Beta-Blockers sowie die Reinsubstanz abwechselnd mit Äthanol und Wasser im Volumenverhältnis 2:1.

## 3.2. Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung

### 3.2.1. Farbreaktionen

Für die Identifizierung der Beta-Blocker sind auch chemische Methoden eingesetzt worden.Zu den ältesten und am einfachsten durchzuführenden Nachweisen gehören die Farbreaktionen.

Da die Analytik der Beta-Blocker erst in den letzten Jahren aktuell wurde und Farbreaktionen den heutigen Anforderungen an Spezifität und Empfindlichkeit in der Regel nicht mehr genügen,existiert für Beta-Blocker kaum Literatur über derartige Verfahren. Die einzigen Studien,die zur Verfügung standen,waren die Dissertation von STANKE (98) und eine Veröffentlichung von AUTERHOFF

und STANKE (13). Diese Autoren teilen mit, daß Phenolderivate wie Oxprenolol und Toliprolol mit Reagenzien, die konzentrierte Schwefelsäure enthalten, meist unter Farbbildung reagieren, und führen derartige Reaktionen sowohl in Lösung als auch auf Kieselgel-Dünnschichtplatten durch (s.a. 3.2.6.). Spezielle Reaktionen geben sie für Phenoläthersubstanzen an: Die Allylverbindung Oxprenolol sei zum Beispiel durch die Entfärbung von Brom oder Kaliumpermanganat charakterisiert.

Die Farbreaktion nach ZWIKKER (12) und die LIEBERMANN-Probe auf Nitrosamine fällt nach STANKE für die Beta-Blocker Oxprenolol und Toliprolol positiv aus. Die Reaktion mit konzentrierter Salpetersäure zeige für Toliprolol eine charakteristische Färbung. Als Spezialreaktion für die aromatische Nitroverbindung Nifenalol geben die genannten Autoren den Nachweis durch Reduktion, Diazotierung und Kupplung an.

### 3.2.2. UV-Spektroskopie

Die UV-Spektroskopie ist für die qualitative und quantitative Bestimmung der Beta-Blocker geeignet, da diese Substanzen in der Regel aromatische oder heterozyklische Ringe im Molekül besitzen, aufgrund derer sie hohe Absorption im ultravioletten Bereich aufweisen. Eine sichere Identifizierung allein durch das UV-Spektrum ist allerdings nicht möglich.

Daher verwendet STANKE (98) diese Methode zur Ergänzung und Bestätigung von Farbreaktionen und dünnschichtchromatographischen Nachweisen. Sowohl für das Aminoäthanolderivat Nifenalol als auch die beiden Phenoläthersubstanzen Oxprenolol und Toliprolol gibt er eine Verschiebung der UV-Kurven der Basen im Vergleich zu denen der Hydrochloride um etwa 1-3 nm nach höheren Wellenbereichen an. Die UV-Spektren stellen für diese Beta-Blocker charakteristische Kurven dar und können somit zur Identifizierung herangezogen werden.

AUTERHOFF und STANKE (13) ziehen diese Methode zur Bestätigung des dünnschichtchromatographischen Nachweises von m-Kresol bzw. Brenzkatechin heran, welche aus Toliprolol bzw. Oxprenolol durch Phenolätherspaltung mit Brom- oder Jodwasserstoffsäure entstehen.

### 3.2.3. Spektrofluorimetrie

Die Fluoreszenz von Beta-Blockern wurde nur von wenigen Autoren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung herangezogen. Diese Methode wurde erstmalig im Jahre 1965 von STOCK und WESTERMANN (99) auf das Toliprolol angewendet. MÖLLMANN et al. (73) untersuchten zur Abklärung von Nifenalol-Metaboliten Nativharn mit diesem Verfahren.

### 3.2.4. IR-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie ist eine der sichersten Nachweismethoden, die zur Zeit in chemisch-toxikologischen Labors praktiziert werden. Gerade bei organischen Substanzen liefern Lage und Intensität der zahlreichen Banden eine Vielzahl von Angaben, während bei anderen Verfahren nur eine einzige Meßgröße anfällt. Der Nachteil liegt in der erforderlichen relativ großen Menge an Substanz von hoher Reinheit. Bei therapeutischer Dosierung liegen jedoch nur sehr geringe Stoffmengen vor, die zudem durch Extraktionsverfahren geschmälert und verunreinigt werden. Somit bleibt die Anwendung der IR-Spektroskopie auf Fälle beschränkt, in denen beispielsweise durch Überdosierung größere Substanzmengen vorhanden sind. Trotzdem spielt auch hier die Gefahr der Verunreinigung durch verschiedene Isolierungsverfahren aus biologischen Proben eine wichtige Rolle, sodaß die IR-Spektroskopie nur zur Sicherung von Ergebnissen, die mit anderen Methoden gewonnen wurden, herangezogen werden sollte.

Derartige Untersuchungen an Beta-Blockern fanden sich nur bei STANKE (98). Er unterscheidet die Phenoläthersubstanzen Oxprenolol und Toliprolol aufgrund der Äthersignale von dem Aminoäthanolderivat Nifenalol. Eine Differenzierung zwischen Oxprenolol und Toliprolol ermöglichen die Carbonyl-, Amino-, Äthyl- und Isopropylgruppen sowie die Banden der Aromaten. Zur entgültigen Unterscheidung der beiden Beta-Blocker zieht er die Substituenten am Aromaten und die Art der Substitution heran.

### 3.2.5. NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanz-Spektroskopie kann, ebenso wie die IR-Spektroskopie zur Überprüfung von Ergebnissen dienen, die mit anderen Nachweismethoden erzielt wurden. Dabei gelten in der Regel dieselben Nachteile und Einschränkungen wie für die IR-Spektroskopie. Als einziger Autor der zur Verfügung stehenden Literatur hat STANKE (98) von den Beta-Blockern Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol NMR-Spektren erstellt. Bei der Interpretation der NMR-Signale unterscheidet er zwischen Äther- und Aminoäthanolderivaten. Zur weiteren Differenzierung dienen die Protonensignale der einzelnen Wasserstoff enthaltenden Gruppen. Ähnlich wie bei der IR-Spektroskopie werden auch hier die unterschiedlichen Substituenten an den aromatischen Ringsystemen zur Identifizierung und Unterscheidung der jeweiligen Substanzen herangezogen.

### 3.2.6. Dünnschichtchromatographie

#### 3.2.6.1. Anwendung der DC zum Nachweis der Beta-Rezeptorenblocker

Wegen des geringeren Zeitbedarfs und der höheren Empfindlichkeit hat die DC zu Anfang der sechziger Jahre die Papierchromatographie, die bis dahin weit verbreitet war, fast völlig verdrängt. Da die Analytik der Beta-Blocker erst zu dieser Zeit aktuell wurde, existieren keine Studien über papierchromatographische Nachweismethoden für diese Pharmaka.

Wegen des alkaloiden Charakters der Beta-Blocker sei zuerst auf einige Studien verwiesen, in denen basische Stoffe dünn-schichtchromatographisch identifiziert werden: VIDIC und SCHÜTTE (107) ziehen zur Ergänzung ihres papierchromatographischen Arbeitsganges für toxikologisch wichtige basische Gifte und Arzneimittel die DC auf Kieselgel mit 0,1n wasserfreier, methanolischer Ammoniaklösung als Fließmittel heran. MULE (78) und MULE et al. (79) haben in ihren Arbeiten über den Routinenachweis von Drogenmißbrauch zwei Systeme für basische Stoffe angegeben. FIKE (38) verwendet für die Chromatographie basischer Substanzen unter Benut-

zung von 0,1n Natronlauge oder 0,1n  $\text{KHSO}_4$ -Lösung hergestellte Kieselgeschichten.

Für den dünnschichtchromatographischen Nachweis von Beta-Blockern insbesondere liegen eine Reihe von Arbeiten vor. Die umfassendste Studie dieser Art ist die Dissertation von STANKE (98), der die Wirkstoffe Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol nach Auflösen der Basen in Methanol und Auftragen auf das Adsorbens SILICAGEL F<sub>254</sub> von MERCK nachweist. Als Fließmittel verwendet er Chloroform/Diäthylamin im Verhältnis 9:1. Die Detektion erfolgt im UV-Licht und nach Besprühen mit verschiedenen Alkaloidfarbstoffen. AUTERHOFF und STANKE (13) spalten die Phenolätherbindungen von Oxprenolol und Toliprolol mit einem siedenden Gemisch aus 48%iger Bromwasserstoff- und Essigsäure, weisen das entstandene Brenzkatechin bzw. m-Kresol dünnschichtchromatographisch in der bei STANKE angegebenen Weise nach und geben die R<sub>f</sub>-Werte an.

MÖLLMANN et al. (73) sowie QUAGLIO und CAVICCHI (87) weisen das Nifenalol im Urin mit Hilfe der DC unter Verwendung verschiedener Fließmittel nach und teilen die R<sub>f</sub>-Werte mit.

ARNDTS und POLLMANN (8) dient die DC zur Analyse und Reinigung von Urinen, Urinextrakten und Elutionsfraktionen bei der Bestimmung von Metaboliten des tritiummarkierten Toliprolol.

RIESS et al. (92) reinigen bei ihren Untersuchungen des Oxprenololmetabolismus die basische Fraktion des AMBERLITE XAD-2 -Urineeluats mit Hilfe der DC, um die so isolierte Reinsubstanz anschließend radiogaschromatographisch-massenspektrometrisch nachweisen zu können. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung verschiedenen lipophiler Anteile der sauren sowie der beiden wasserlöslichen Fraktionen führt zur Isolierung von insgesamt fünf Metaboliten des Oxprenolol.

Die hier erwähnten Autoren verwenden im allgemeinen das SILICAGEL F<sub>254</sub> von MERCK als Adsorbens. Die von ihnen gewählten Fließmittelsysteme sind der Übersicht unter Gliederungspunkt 3.2.6.2. zu entnehmen.

## 3.2.6.2. Gebräuchliche Fließmittel

| Kieselgel mit und ohne Gips                                                  |               | Literatur  |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|
| Aceton/Petroläther                                                           | 1:1           | (87)       |
| Äthanol/H <sub>2</sub> O/Eisessig                                            | 100:40:6      | (87)       |
| Äthylacetat/H <sub>2</sub> O/Äthanol/<br>Butanol/NH <sub>3</sub>             | 50:40:30:10:1 | (87)       |
| Äthylacetat/Methanol/H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub>                        | 85:10:3:1     | (78)       |
| Benzol/Aceton/Eisessig                                                       | 7:3:1         | (13,98)    |
| Benzol/Aceton/NH <sub>3</sub>                                                | 50:50:1       | (61)       |
| Benzol/Äthanol                                                               | 9:1           | (13)       |
| Benzol/Diäthylamin                                                           | 9:1           | (98)       |
| Benzol/Diäthylamin                                                           | 15:5          | (98)       |
| Benzol/Diäthylamin                                                           | 19:1          | (98)       |
| Butanol/H <sub>2</sub> O/Essigsäure                                          | 75:21:7,5     | (92)       |
| Butanol/H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> /Äthanol                            | 90:40:10:1    | (87)       |
| Butanol/NH <sub>3</sub>                                                      | 200:3         | (87)       |
| Chloroform/Aceton                                                            | 9:1           | (33)       |
| Chloroform/Aceton                                                            | 85:15         | (117)      |
| Chloroform/Äther/Äthanol                                                     | 70:30:30      | (29)       |
| Chloroform/Diäthylamin                                                       | 9:1           | (13,98)    |
| Chloroform/Isopropanol/NH <sub>3</sub>                                       | 70:35:0,7     | (26)       |
| Chloroform/Isopropanol/NH <sub>4</sub> OH                                    | 60:35:5       | (8)        |
| Chloroform/Methanol/NH <sub>3</sub>                                          | 99:10:1       | (78)       |
| Cyclohexan/Diäthylamin                                                       | 9:1           | (117)      |
| Cyclohexan/Diäthylamin                                                       | 18:2          | (98)       |
| Essigsäure-Isobutylester/Aceton/<br>Butanol/H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> | 50:40:30:6:4  | (116,117)  |
| Methanol/Chloroform/H <sub>2</sub> O                                         | 10:10:2       | (73)       |
| Methanol/Isobutylalkohol                                                     | 3:2           | (87)       |
| Methanol mit 0,17% NH <sub>3</sub>                                           |               | (117)      |
| Methanol/NH <sub>3</sub>                                                     | 100:1,5       | (87)       |
| Methanol/NH <sub>3</sub>                                                     | 99:1          | (27,29,78) |
| Methylenchlorid/Methanol/H <sub>2</sub> O                                    | 79:15:2       | (87)       |
| <hr/> Kieselgel mit 0,1n NaOH bzw. 0,1m KHSO <sub>4</sub> <hr/>              |               |            |
| Cyclohexan/Benzol/Diäthylamin                                                | 75:15:10      | (38)       |
| Methanol                                                                     |               | (38)       |

### 3.2.6.3. Detektionsmittel

In der Literatur werden zur Detektion der Beta-Blocker hauptsächlich die allgemeinen Sprühreagenzien für Basen wie z.B. DRAGENDORFFs Reagenz nach MUNIER und MACHEBOEUF oder MAYERs Reagenz verwendet (117).

MACEK und VECERKOVA (65) besprühen die Platten – hauptsächlich zur Detektion von phenothiazinähnlichen Ringsystemen – mit 50%iger wässriger Schwefelsäure und erhitzen anschließend auf 150°C. MULE (78) benutzt eine Konzentration von 5%.

Die Verwendung von Eisen(III)-Chlorid-Lösung allein und zur Farbverstärkung nach DRAGENDORFFs Reagenz geben CUYPERS (29), KÜCHLIN (61) und GOENECHEA (44) an.

STANKE (98) fand, daß die Beta-Blocker Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol nach der Behandlungsvorschrift von MACEK und VECERKOVA und Besprühen mit DRAGENDORFFs oder MAYERs Reagenz positive Reaktion zeigen. Mit Mandelin-Reagenz konnte er bei Nifenalol, mit MARQUIS- und FROEHDE-Reagenz bei Toliprolol brauchbare Färbungen, jeweils bereits vor dem Erhitzen erzielen. Eine charakteristische Anfärbung von Oxprenolol gelang ihm durch Zusatz von ERDMANN-Reagenz ebenfalls vor Erhitzung der Kieselgelplatte. Nifenalol läßt sich im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen nicht mit allgemeinen Reagenzien wie MARQUIS oder Vanillin-Schwefelsäure nachweisen.

QUAGLIO und CAVICCHI (87) erzielen bei ihren dünnschichtchromatographischen Studien eine gute Anfärbarkeit des Nifenalol mit DRAGENDORFFs Reagenz, Jodoform, in Methanol gesättigter Molybdän-Phosphorsäure sowie Para-Dimethylaminobenzaldehyd.

### 3.2.7. Gaschromatographie

Seit dem Ende der sechziger Jahre wird die Gaschromatographie wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und Trennleistung auch auf dem Gebiet der Beta-Blocker-Analytik eingesetzt.

Eine allgemeine gaschromatographische Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Aminen und Alkoholen geben WALLE

und EHRSSON (110) in ihrer Studie aus dem Jahre 1970 an. Sie bestimmten 21 Substanzen, die sich in ihrer chemischen Struktur stark voneinander unterscheiden. Die kleinste, mit dem Electron Capture Detector noch erfaßbare Menge betrug 0,3 pg. Dabei handelte es sich um Anilin, welches mit Heptafluorbuttersäure derivatisiert worden war. Für Alkohole und Amine wählten diese Autoren das relativ polare Phenylsilikonöl OV17, das auch ALBER (6) zum Nachweis von Alkoholen benutzte. Während sie mit 2% Carbowax 20m hauptsächlich Alkohole trennten, erwies sich für Amine, die als freie Basen vorliegen, die Modifikation dieser Phase mit 0,5% KOH als geeignet.

BORG et al. (20) verwenden zum Nachweis des Metoprolol und seiner Metaboliten ein Phasengemisch aus 5% OV1 und 5% OV17. Für die quantitative Bestimmung dieses Beta-Blockers in Urin und Plasma benutzt ERVIK (36) die stationären Phasen JXR, QF1 (Fluorsilikonöl) sowie OV17. Er setzt die in Benzol gelöste, derivatisierte Substanz zur Chromatographie ein und gibt die jeweiligen Retentionszeiten an. Als interner Standard dient ihm das 9-Bromphenanthren, welches er nach Extraktion und Derivatisierung zusetzt. Diese Bezugssubstanz läßt sich am besten auf der Phase QF1 von Metoprolol trennen. Mit diesem Verfahren sind Beta-Blocker-Konzentrationen von 5ng/g Injektionslösung mit einer relativen Standardabweichung von 0,7ng bestimmbar. Diese Empfindlichkeit ist erforderlich, um extrem niedrige Konzentrationen, wie sie nach therapeutischer Dosierung vorliegen, nachweisen zu können. JOHNSSON et al. (55) und REGÅRDH et al. (90) bedienen sich dieser Methode sowie der stationären Phase JXR, um im Rahmen ihrer pharmakokinetischen Untersuchungen verschiedene Metoprolol-Konzentrationen im Plasma zu bestimmen. JACK und RIESS (52) sowie NAMBARA et al. (80) ziehen die von ERVIK (36) für das Metoprolol vorgeschlagene Nachweisteknik zur Feststellung der Oxprenolol-Blutspiegel heran. Als internen Standard setzen sie den Beta-Blocker Alprenolol ein. Im Gegensatz zu ERVIK und NAMBARA et al. benutzen JACK und RIESS die stationäre Phase OV101 und fügen als Verbesserung des Verfahrens die Referenzsubstanz bereits vor Extraktion und Derivatisierung hinzu. Somit kompensieren sie Verluste des gesuchten Stoffes, die durch diese Vorgänge unvermeidlich sind. WALLE (109) entwickelte im Jahre 1974 ein hochspezifisches und außerordentlich empfindliches gaschro-

matographisches Verfahren, mit dem er u.a. Toliprolol sowie Oxprenolol und vier seiner wichtigsten Metaboliten in Konzentrationen, wie sie in biologischen Flüssigkeiten bei therapeutischer Dosierung vorliegen, qualitativ und quantitativ nachweisen konnte. Dabei verwendete er die Phase 2 $\phi$ V 17 auf Chromosorb WAW-DMCS und gibt die Retentionszeiten der identifizierten Substanzen an. Als internen Standard benutzte er das 1-Bromnaphthalen. Die kleinste hierbei noch bestimmbare Konzentration beträgt 0,1 ng/ml Plasma. Diese Methode ermöglicht die quantitative Feststellung von Plasmaspiegeln noch 12-24 Stunden nach einer geringen intravenös applizierten Einzeldosis. Der Autor vermutet, daß dieses Verfahren für die Bestimmung sämtlicher Beta-Blocker und vieler ihrer Metaboliten in Urin, Plasma und Geweben geeignet sei. MASON und WINER (68) konnten dies für den Beta-Blocker Oxprenolol bestätigen. TINDELL et al. (106) und WALLE et al. (112, 113) ziehen bei ihren Untersuchungen der Propranolol-Metaboliten das Oxprenolol als Bezugssubstanz heran. Aus diesem Grunde wurden die von den genannten Autoren angegebenen OV1-Phasen und gaschromatographischen Arbeitsbedingungen in die Tabelle 2 (Seite 26/27) aufgenommen.

QUAGLIO und CAVICCHI (87) untersuchten das Nifenalol aus menschlichem Plasma auf sechs verschiedenen Phasen, konnten jedoch nur bei der Säulenpackung 10% DC510 die Retentionszeit angeben.

STANKE (98) gelang mit Hilfe der GC der Nachweis, daß bei der Phenolätherspaltung mit Bromwasserstoffsäure von Oxprenolol und Toliprolol aus der Isopropylaminopropan-2-ol-Seitenkette Allylbromid entsteht. Dieses setzt sich bei Toliprolol mit überschüssiger HBr zu dem thermisch stabileren, gaschromatographisch nachweisbaren 1,3-Dibrompropan um, das beim Oxprenolol sowohl aus der Alkyl- als auch aus der Allyl-Seitenkette gebildet werden kann.

Die in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Verfahren basieren in der Regel auf Lösungsmittlextraktion und Bildung eines meist fluorierten Derivats (s. 3.2.7.1.). Im allgemeinen wurden Glassäulen von 3-6 ft Länge und 2-4 mm Innendurchmesser verwendet. Ausnahmen bilden STANKE (98) und ERVIK (35, 36), die für ihre stationären Phasen 10% UCCW96 bzw. 3% QF1 Stahlsäulen in den genannten Dimensionen benutzen. Die meisten Autoren bestätigen die Struktur von gaschromatographisch detegierten Substanzen in einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse.

Tabelle 2 : In der Literatur angegebene gaschromatographische  
Arbeitsbedingungen und Säulenpackungen

| Stationäre Phase              | Trägermaterial (mesh)          | Detektor (°C) |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 2% Carbowax 20m               | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD (165 ±1)  |
| 2% Carbowax 20m<br>+ 0,5% KOH | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD (165 ±1)  |
| 10% DC710                     | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | FID (250)     |
| 10% DC510                     | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | FID (250)     |
| 3% JXR                        | Chromosorb Q, (100-120)        | ECD (300)     |
| 2% OV1                        | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD           |
| 4% OV1                        | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD           |
| 10% OV1                       | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD           |
| 5% OV1 + 5% OV17              | Chromosorb W, (80-100)         | FID (200)     |
| 14% OV17                      | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD           |
| 2% OV17                       | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD (270)     |
| 2% OV17                       | Chromosorb Q, DMCS, (80-100)   | FID (250)     |
| 2% OV17                       | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | ECD (165 ±1)  |
| 3% OV17                       | Chromosorb Q, (100-120)        | ECD           |
| 3% OV101                      | Chromosorb Q, (80-100)         | ECD (280)     |
| 3% QF1                        | Chromosorb Q, (100-120)        | ECD (200)     |
| 3% QF1                        | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | FID (250)     |
| 5% QF1                        | Chromosorb W,AW-DMCS, (80-100) | FID (250)     |
| 10% SE52                      | Chromosorb W,AW-DMCS, (60-80)  | FID (260)     |
| 15% SP2250                    | Supelcoport (100-120)          | FID (250)     |
| 10% UCCW96                    | Chromosorb W,AW-DMCS, (60-80)  | FID           |

| Injektor Temp. (°C) | Ofentemp. (°C) | Trägergas (ml/min)  | Lit.      |
|---------------------|----------------|---------------------|-----------|
| -                   | -200           | N <sub>2</sub> (25) | (110)     |
| -                   | -200           | N <sub>2</sub> (25) | (110)     |
| 250                 | 185            | He (30)             | (87)      |
| 250                 | 215            | He (30)             | (87)      |
| -                   | 160            | Ar + 5% Methan (50) | (36)      |
| -                   | -              | He (10)             | (106)     |
| -                   | 180            | He (10)             | (112)     |
| 260                 | 230            | He (20)             | (113)     |
| -                   | -              | H <sub>2</sub> (54) | (20)      |
| -                   | 200            | - (10)              | (108)     |
| 230                 | 170            | N <sub>2</sub> (30) | (68, 109) |
| 250                 | 200            | He (30)             | (87)      |
| -                   | -200           | N <sub>2</sub> (25) | (110)     |
| -                   | 175            | Ar + 5% Methan (50) | (36)      |
| 210                 | 158            | N <sub>2</sub> (68) | (52)      |
| 230                 | 170            | N <sub>2</sub> (50) | (35)      |
| 250                 | 180            | He (30)             | (87)      |
| 250                 | 180            | He (30)             | (87)      |
| 200                 | 110            | N <sub>2</sub> (48) | (98)      |
| 250                 | 180            | He (30)             | (87)      |
| -                   | -              | -                   | (98)      |

### 3.2.7.1. Derivatisierung

Die Derivatbildung kann zur Inaktivierung von wasserstoffbrückenbildenden Strukturen wie phenolischen und alkoholischen Hydroxylgruppen sowie sekundären Aminen herangezogen werden. Im Rahmen der GC dient dies der Herabsetzung von Wechselwirkungen zwischen den reaktiven Molekülteilen einer stationären Phase und der zu analysierenden Substanz. Dadurch werden bessere Peakformen und höhere quantitative Resultate aufgrund geringerer Verluste an Probenmaterial durch verminderte Retention in der GC-Säule erzielt.

Da in der Literatur zur Detektion der Beta-Blocker zumeist ein Electron Capture Detector (ECD) verwendet wird und derartige Stoffe in underivatisierter Form ein zu schwaches Signal auslösen würden, ist ihre Umstrukturierung mit verschiedenen Reagenzien notwendig. Diese lassen sich einteilen in siliciumorganische Verbindungen, perfluorierte Anhydride von niederen Fettsäurehomologen und andere wie z.B. 2,4-Dinitrofluorbenzol.

BUTTS (24) empfiehlt die Derivatisierung von Aminen mit bis-(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid. BORG et al. (20) derivatisieren unverändertes Metoprolol sowie dessen Metaboliten nach Extraktion aus Urin ebenfalls zu den entsprechenden Trimethylsilylabbkömmlingen, die sich gaschromatographisch gut voneinander trennen lassen. WALLE (108) detegiert verschiedene Amine als 2,4-Dinitrophenylverbindungen. Auf diese Weise derivatisiert dieser Autor (119) verschiedene Stoffwechselprodukte aus der oxidativen Desaminierung des Oxprenolol und empfiehlt dieses Verfahren für sämtliche Metaboliten von Beta-Blockern, die wie das Oxprenolol eine N-Isopropylgruppe kennzeichnet und denen der Stoffwechselweg der oxidativen Desaminierung zu eigen ist.

Die Derivatisierung mit Heptafluorobuttersäure- und Trifluoracetanhydrid wird in der Literatur für Beta-Blocker am häufigsten beschrieben. ÅNGGÅRD und SEDVALL (2), WILK et al. (115) und CLARKE et al. (28) verwenden diese Reagenzien zur Derivatisierung von Aminen und Katecholaminmetaboliten.

WALLE und EHRSSON (110) haben erstmalig eine Derivatisierungsvorschrift veröffentlicht, die den quantitativen Nachweis von Aminen und Alkoholen mit zufriedenstellender Genauigkeit im Pikogrammbe- reich ermöglicht. Die zu untersuchenden Substanzen werden zu Hep-

tafluorobutyrylabkömmlingen derivatisiert. Unter optimalen Bedingungen gelingt mit dieser Methode die quantitative Acylierung selbst für Aminogruppen mit ungünstiger sterischer Konfiguration. Da diese Derivate stark flüchtig sind, können sie, sofern ihr Molekulargewicht den Wert von 270 nicht überschreitet, bei Säulentemperaturen unter 200°C analysiert werden.

NAMBARA et al. (80) sowie JACK und RIESS (52) ersetzen die beiden reaktiven Wasserstoffe in der Seitenkette des Oxprenolol, ERVIK (36), JOHNSSON et al. (55) und REGÅRDH et al. (90) in der Seitenkette des Metoprolol durch Trifluoracetylgruppen. WALLE (109) fand, daß das ECD-Signalgrößenverhältnis von Trifluoracetylierung zu Heptafluorobutyrylierung bei Beta-Blockern in etwa den Fluoräquivalenten entspricht, wohingegen bei den mitextrahierten endogenen monofunktionellen Amino-, Alkohol- und Phenolverbindungen aus Urin ein Signalgrößenverhältnis von 1/100 bis 1/1000 zu verzeichnen sein soll. Dies bedeutet eine Selektivitätserhöhung durch Trifluoracetylierung gegenüber der Heptafluorobutyrylierung durchschnittlich um den Faktor 250. Deshalb empfiehlt WALLE zur Derivatisierung von Beta-Blockern in biologischen Extrakten die Trifluoracetylierung mit Trimethylamin als Katalysator.

Die Fluor- und Silylverbindungen besitzen zwar gute gaschromatographische Eigenschaften, zeigen aber nach ÅNGGÅRD und SEDVALL (2) sowie KAUERT (56) eine große Hydrolyseempfindlichkeit der Esterbindung, deren Ursache auf den stark elektronegativen Charakter der Fluoratome zurückzuführen ist. Aufgrund der starken Abhängigkeit der Stabilität dieser Derivate von äußeren Bedingungen (so z.B. Arbeiten unter Feuchtigkeitsausschluß) scheinen diese Reagenzien für die routinemäßige Derivatisierung ungeeignet. Der entscheidende Nachteil dieser Verfahren ist jedoch, daß sie nur in wasserfreiem Medium durchführbar sind.

Um den genannten Mängeln zu begegnen, hat KAUERT (56) für biogene Amine eine Derivatisierungsmethode mit Propionsäureanhydrid entwickelt, bei der gleichzeitig die Substanzen im Urin derivatisiert und mit organischem Lösungsmittel extrahiert werden können. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens für die Beta-Blocker-Derivatisierung wird im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit untersucht.

### 3.2.8. Verschiedene Nachweismethoden

Unter Anwendung der wasserfreien Titration, die sowohl potentiometrisch als auch mit indikativer Äquivalenzpunktbestimmung durchgeführt wurde, konnte STANKE (98) die Beta-Blocker Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol quantitativ nachweisen. Dabei dienten ihm 0,05n Perchlorsäure als Titrationssubstanz und das 1-Naphtholbenzein als Farbindikator. Auch die Verdrängungstitration mit 0,1n Natronlauge in einem Gemisch aus Äthanol und Chloroform erwies sich als geeignetes Verfahren zum quantitativen Nachweis der Hydrochloride der genannten Beta-Adrenolytika.

Schließlich sei erwähnt, daß die bei STANKE (98) angegebenen Nachweismethoden nur für Reinsubstanzen geeignet und im biologischen Medium nicht durchführbar sind.

### 3.3. Ergebnis der Literaturübersicht

Für die Beta-Blocker Metoprolol, Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol finden sich in der Literatur sowohl auf dem Gebiet der Analytik wie auch dem des Verhaltens im Organismus zahlreiche Studien. Lediglich für die Substanz Metipranolol stand keine Literatur zur Verfügung.

Stoffwechseluntersuchungen wurden zum Teil unter Vernachlässigung von Faktoren wie Dosierungsform, Applikationsmodus u.a. durchgeführt, obwohl diese die Pharmakokinetik und den Metabolismus der jeweiligen Substanzen wesentlich beeinflussen. Dadurch wird die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studien eingeschränkt. Ferner fehlen häufig quantitative Angaben der nachgewiesenen Stoffwechselmetaboliten, sodaß Rückschlüsse auf das Ausmaß ihrer biologischen Bedeutung nicht möglich sind.

Bei therapeutischer Dosierung liegen die Konzentrationen von Beta-Blockern in Körperflüssigkeiten während der ersten 24 Stunden nach Applikation im Nanogrammbereich. Diese geringen Mengen beschränken die Anwendbarkeit von Farbreaktionen, IR- und NMR-Spektroskopie sowie der DC auf Vergiftungsfälle mit starker Überdosierung. Optische Methoden wie UV-Spektroskopie und Spektrofluorimetrie besitzen häufig die erforderliche Empfindlichkeit, werden jedoch aufgrund

ihrer geringen Spezifität zur Analytik von Beta-Blockern nur selten herangezogen. Die beschriebenen Extraktions- und Nachweisverfahren eignen sich nur in wenigen Fällen dazu, die bei therapeutischer Dosierung vorliegenden Konzentrationen spezifisch zu erfassen.

Ausreichende Empfindlichkeit und Spezifität bieten in der Regel nur gaschromatographische Methoden und die mit einem Trennverfahren verbundenen Radio-Tracer-Techniken. Letztere werden ausschließlich bei Stoffwechseluntersuchungen eingesetzt, erfahren aber durch die Strahlenbelastung eine wesentliche Einschränkung ihrer Anwendungshäufigkeit.

Die in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Nachweismethoden eignen sich in der Regel nur zur Analyse einer einzigen Substanz. Ein Verfahren, mit dem ein Spektrum von mehreren Beta-Blockern gleichzeitig erfaßbar ist, wurde bisher noch nicht entwickelt.

#### 4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ziel dieser Arbeit war es, für die rechtsmedizinische Laborpraxis eine schnelle und einfache Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe ein größeres Spektrum von Beta-Blockern aus biologischem Material, vornehmlich aus Urin, selektiv extrahiert und nachgewiesen werden kann. Da die in der Literatur beschriebenen Verfahren jeweils nur zur Analyse einer einzigen Substanz geeignet sind, war es im Hinblick auf forensisch-toxikologische Zwecke besonders wichtig, die zu untersuchenden Beta-Blocker vollständig voneinander trennen zu können.

Zu diesem Zweck wurde unter anderem die Verwendbarkeit der Dünnschicht- und insbesondere der Gaschromatographie überprüft, die zur Zeit als eines der empfindlichsten Analytik-Verfahren gilt. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine auf den Durchschnitt der Beta-Blocker optimierte Methode zu entwickeln, die es gestattet, geringe Wirkstoffmengen, wie sie bei therapeutischer Dosierung in biologischen Flüssigkeiten vorliegen, selektiv und mit möglichst hoher Ausbeute zu extrahieren.

Gegenstand dieser Studien waren die Beta-Blocker Metipranolol, Metoprolol, Nifenalol, Oxprenolol und Toliprolol. Sie enthalten ausnahmslos je einen Phenylrest und eine sekundäre Aminogruppe. Nifenalol unterscheidet sich zudem als Äthanolderivat von den übrigen Stoffen mit Ätherstruktur.

Die Beta-Rezeptorenblocker standen als Reinsubstanzen in Hydrochloridform zur Verfügung.

##### 4.1. Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden 0,25mm Kieselgelplatten POLYGRAM<sup>R</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> der Firma MACHEREY-NAGEL & CO mit 15 µl wässriger, basischer Beta-Blocker-Lösungen der Konzentration 1mg/ml beschickt. Die Laufhöhe betrug 10 cm. Der Tabelle 3 lassen sich die verwendeten Fließmittel, ihre Zusammensetzung sowie Laufzeiten entnehmen.

Tabelle 3 : Geprüfte Fließmittel

| Fließm. | Zusammensetzung                                                                             | Laufzeit<br>(min) | Lit.       |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------|
| 1       | Chloroform/Aceton 85:15                                                                     | 30-45             | (117)      |
| 2       | Chloroform/Diäthylamin 9:1                                                                  | 45                | (13,98)    |
| 3       | Chloroform/Isopropanol/NH <sub>3</sub><br>70:35:0,7                                         | 60                | (26)       |
| 4       | Essigsäure-Isobutylester/Aceton/<br>n-Butanol/H <sub>2</sub> O/NH <sub>3</sub> 50:40:30:6:4 | 30-45             | (116,117)  |
| 5       | Methanol/NH <sub>3</sub> 99:1                                                               | 30                | (27,29,78) |

Tabelle 4 : hRf-Werte

| INN          | Handelsname     | Fließmittelsysteme |      |      |      |      |
|--------------|-----------------|--------------------|------|------|------|------|
|              |                 | 1                  | 2    | 3    | 4    | 5    |
| Metipranolol | Disorat         | 0                  | 0,86 | 0,47 | 0,43 | 0,36 |
| Metoprolol   | Beloc, Lopresor | 0                  | 0,47 | 0,36 | 0,43 | 0,43 |
| Nifenalol    | Beta-Intensain  | 0                  | 0,31 | 0,44 | 0,53 | 0,51 |
| Oxprenolol   | Trasicor        | 0                  | 0,56 | 0,43 | 0,49 | 0,40 |
| Toliprolol   | Doberol         | 0                  | 0,48 | 0,37 | 0,48 | 0,46 |

Tabelle 5 : Anfärbarkeit der Beta-Blocker

| INN          | MARQUIS   | DRAGENDORFF | KIEFFER* | HgNO <sub>3</sub> -Diphenylcarbazon |
|--------------|-----------|-------------|----------|-------------------------------------|
| Metipranolol | -         | orange      | blau     | -                                   |
| Metoprolol   | -         | orange      | blau     | -                                   |
| Nifenalol    | -         | orange      | blau     | -                                   |
| Oxprenolol   | violett   | orange      | blau     | -                                   |
| Toliprolol   | braunrosa | orange      | blau     | -                                   |

\* Zusammensetzung von KIEFFERS Reagenz auf Morphin :

Gleiche Teile Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung 1% und  
Eisen(III)-Chlorid-Lösung 10% (120)

Tabelle 4 zeigt die gefundenen  $h_{Rf}$ -Werte. Bei Fließmittel 1 blieben alle Substanzen am Auftragsort, da die Beta-Blocker in Chloroform-Aceton aufgrund großer Polaritätsdifferenzen sehr schlecht löslich sind.

Die Farbreaktionstests wurden mit Reagenzien nach MARQUIS, DRAGENDORFF und KIEFFER sowie  $HgNO_3$ -Diphenylcarbazon durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Die mit den erprobten Fließ- und Anfärbemitteln erzielten Resultate sind unbefriedigend, da sich die Trennleistung des Verfahrens sowie die Spezifität und besonders die Empfindlichkeit der Alkaloidfarbreaktionen als zu gering erwies, um extrem niedrige Stoffmengen, wie sie nach therapeutischer Dosierung in Körperflüssigkeiten vorliegen, identifizieren zu können.

Bei der Untersuchung authentischer Urinproben nach Beta-Blocker-Medikation gelang deshalb der dünnsschichtchromatographische Nachweis nicht.

## 4.2. Gas chromatographie

Da sich die Dünnschichtchromatographie aus den genannten Gründen als ungeeignet erwiesen hatte, wurde die Beta-Blocker-Analytik mit Hilfe der Gaschromatographie fortgesetzt. Neben einer besseren Auftrennung der Substanzen konnte auch eine ausreichende Empfindlichkeit im ppm- und ppb-Bereich erwartet werden, wie sie zum Nachweis von Pharmakakonzentrationen nach therapeutischer Dosierung gefordert wird.

### 4.2.1. Zur Problematik der Gaschromatographie

Bevor die in der vorliegenden Studie verwendeten Arbeitsbedingungen, Säulenpackungen und Programme vorgestellt werden, seien einige Bemerkungen zur Problematik der GC gestattet. Die wichtigsten labor-technischen Parameter sind im folgenden aufgezählt und erläutert. Im Rahmen der geometrischen Abmessungen eines Gaschromatographen

lassen sich Länge und Innendurchmesser der Säule variieren. So ist z.B. bei Testsubstanzen mit hohem Molekulargewicht darauf zu achten, daß die Säule kurz und der Innendurchmesser gering gehalten werden, um keine zu langen Retentionszeiten und zu breiten Peaks zu erhalten.

Edelstahl, Kupfer, Aluminium und Glas stehen als handelsübliche Säulenmaterialien zur Verfügung. Während man zur Analytik nicht reaktiver Substanzen wie Ester meist Säulen aus rostfreiem Stahl verwendet, besteht bei wasserstoffbrückenbildenden Molekülen die Gefahr der Wechselwirkung mit der Metalloberfläche. In solchen Fällen ist das inerte Glas zu bevorzugen.

Die üblichen Säulenpackungen setzen sich aus einem feinkörnigen, hochporösen Trägermaterial und dessen organischer, polymerer Beschichtung (Phase) zusammen, welche bei Arbeitstemperaturen in den flüssigen Zustand übergeht und die Testsubstanzen nach ihren Löslichkeitseigenschaften verschieden stark absorbiert. Deshalb handelt es sich bei derartigen Verfahren genommen um eine Gas-Flüssigkeits-Chromatographie.

Die Trägermaterialien werden meist aus Diatomeenerde gewonnen und in mehreren Korngrößen und Oberflächenbehandlungen angeboten. Die gebräuchlichen Körnungen sind 60/80 mesh (entspricht  $250\text{--}177\mu\text{m}$   $\phi$ ), 80/100 mesh ( $177\text{--}149\mu\text{m}$   $\phi$ ) als meistverwendete und 100/120 mesh ( $149\text{--}125\mu\text{m}$   $\phi$ ) als trennwirksamste Stufe. Struktur und chemische Oberflächenbeschaffenheit haben wesentlichen Einfluß auf die Effektivität einer Säulenpackung in bezug auf Schmalheit und Tailing der Peaks: Bei Proben mit funktionellen Gruppen wie  $\text{-OH}$  oder  $\text{-NH}_2$  kann es trotz Spezialbehandlungen der Trägermaterialoberfläche zu Adsorption der Testsubstanzen auf dem Trägermaterial kommen. Gute GC-Ergebnisse sind deshalb nicht zuletzt auf die sorgfältige Wahl des Trägermaterials zurückzuführen.

Höchst vielfältig substituierte Polymere wie Squalan, Polyäthylenglykole, Silikon- oder Apiezonfette stehen als stationäre Phasen zur Verfügung. Bei ihrer Verwendung ist zu berücksichtigen, daß die thermische Stabilität bei den erforderlichen Temperaturen, die u.a. durch die Siedepunkte der Proben bestimmt werden, gewährleistet sein muß. Allgemein gilt, daß eine Phase gleiche chemische Strukturen und Polaritätseigenschaften wie die Testsubstanzen haben sollte, also z.B. Carbowax bei Alkoholen, Polyester bei Estern und Apiezon bei Kohlenwasser-

stoffen. Um bei der Fülle von Modifikationen eine gezielte Auswahl der geeigneten Phasen treffen zu können, haben ROHRSCHEIDER (94) und später McREYNOLDS (69) Datensysteme auf der Grundlage der KOVATSSchen Retentionsindices (60) entwickelt, womit alle Phasen durch eine Reihe charakteristischer Werte gekennzeichnet werden können. Diese Daten geben Aufschluß über das Polaritätsverhalten der jeweiligen Phase gegenüber einem Spektrum verschiedener Stoffgruppen relativ zu einer definierten, unpolaren Squalanphase bei identischen Bedingungen von 100°C und 20% stationärer Phase auf Chromosorb W, AW. Tabelle 6 zeigt einige Stoffgruppen mit Referenzsubstanzen nach ROHRSCHEIDER.

Die Differenz der Retentionsindices (RI) einer bestimmten chemischen Struktur aus einer der Stoffgruppen auf polarer und Squalanphase ergibt einen  $\Delta I$ -Wert, der für seine zugehörige chemische Struktur steht und proportional zur Polaritätsübereinstimmung der getesteten Phase mit dieser chemischen Struktur ist. Die Summe aller  $\Delta I$ -Werte ist proportional zum Polaritätsunterschied der betreffenden Phase zu Squalan. Aus jeder Stoffgruppe wird eine Substanz gewählt und ihr  $\Delta I$ -Wert auf oben beschriebene Weise ermittelt.

Wenn nun geeignete Phasen gefunden werden sollen, müssen die Testsubstanzen entsprechend Tabelle 6 analysiert werden. Da größere Moleküle meist polyvalente Funktion aufweisen, ist zu klären, welcher dieser Effekte dominiert. Die Auswahl einer geeigneten Phase erfolgt letztlich nach den höchsten  $\Delta I$ -Werten bei den Stoffgruppen, die den Probesubstanzen zugeordnet wurden. Brauchbare Phasen zur Trennung gesättigter und ungesättigter Fettsäureester sollen z.B. auf der Basis hoher  $x\text{-}\Delta I$ -Werte (Olefine) ausgesucht werden, da diese gute Übereinstimmung der Polaritätseigenschaften bedeuten, woraus vollständige Elution und zufriedenstellende Peakformen resultieren.

Zur Konzentration der stationären Phase auf dem Trägermaterial ist zu erwähnen, daß diese neben Länge und Innendurchmesser der Säule und natürlich der Temperatur die Retentionszeiten beeinflusst. Demnach sind für Testsubstanzen mit hohem Molekulargewicht statt der üblichen Konzentration von 3-10% Trägermaterialien mit 1-2% Beschichtung einzusetzen.

Zur Ermittlung der richtigen Ofen- oder Säulentemperatur sind fol-

Tabelle 6 : Stoffgruppen mit Referenzsubstanzen nach ROHRSCHEIDER

| $\Delta$ I-Symbole | x                           | y                                                                                                                                        | z                                                                                                                           | u                                    | s                   |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Stoffgruppen       | Intermolekular-<br>kräfte   | Elektronen-<br>anziehende                                                                                                                | Elektronen-<br>abstoßende                                                                                                   | Komplex-<br>bildner                  | Komplex-<br>bildner |
| Beispiele          | Aromate (Benzol)<br>Olefine | Alkohole<br>(1-Butanol)<br>Nitrile<br>Carbonsäuren<br>-CHCl <sub>2</sub><br>-CCl <sub>3</sub><br>-CH <sub>2</sub> Cl<br>-NO <sub>2</sub> | Ketone (Methyl-<br>äthylketon,<br>2-Pentanon)<br>Äther<br>Aldehyde<br>Ester<br>Epoxide<br>-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | Nitrome-<br>than<br>Nitropro-<br>pan | Pyridin<br>Dioxan   |

gende Kriterien zu berücksichtigen :

Eine zu niedrige Säulentemperatur führt zur Verbreiterung der Peaks und zur Erhöhung der Elutionszeit bis zur völligen Retention der Substanzen in der Säule. Voraussetzung für die Elution von Probelösungen ist nämlich, daß die Säulentemperatur über den Siedepunkten der zu eluierenden Substanzen liegt. Bei hochmolekularen Verbindungen stellt dies u.U. besondere Anforderungen an die Thermostabilität des Säulenfüllmaterials.

Befindet sich die Ofentemperatur hingegen nahe der Thermostabilitätsgrenze der Phase, werden Teile des Polymers flüchtig und durch das Trägergas eluiert. Dies wird als "Säulenbluten" bezeichnet und macht sich im Chromatogramm als Ansteigen der Basislinie bemerkbar. Steigt die Temperatur über dieses Limit, verstärkt sich das "Bluten" zusehens und die Säule wird verhältnismäßig kurzlebig.

Für jene Fälle, in denen bei isothermen Bedingungen auf einem Chromatogramm mehrere Substanzen mit weit auseinanderliegenden Retentionszeiten Platz finden müßten, wurde die Möglichkeit geschaffen, die Ofentemperatur zwischen wählbaren Grenzen mit exakt einstellbarer Rate ansteigen zu lassen. Damit kann erreicht werden, daß die als erste eluierten Substanzen nicht zu früh erscheinen und die letzten noch zufriedenstellende Peakformen ergeben.

Die Temperatur des Injektorblocks sollte deutlich über der Säulentemperatur sowie den Siedepunkten der Probesubstanzen liegen, um diese sofort nach dem Einspritzen in gasförmigen Zustand zu versetzen. Auch die Temperatur des Detektors muß über derjenigen des Ofens gehalten werden, um Kondensation der gasförmigen Testmoleküle an den Detektorinnenwänden zu vermeiden.

Vor dem gaschromatographischen Gebrauch frischer Säulenpackungen ist es unumgänglich, diese zu konditionieren. Dabei wird die Säule unter Trägergasstrom innerhalb von zehn Stunden von Zimmer- auf Betriebstemperatur erwärmt. Auf diese Weise werden besonders flüchtige Teile der stationären Phase und letzte Spuren des herstellungstechnischen Lösungsmittels eluiert, welche bei sofortiger Inbetriebnahme der Säule erhebliche Schwankungen der Basislinie verursacht hätten.

Ein weiteres negatives Moment der GC ist das sog. Tailing. Dieser Effekt bedeutet, daß ein Teil der Testsubstanzen während des Säu-

lendurchgangs besonderen chemischen Wechselwirkungen unterliegt und deshalb etwas später eluiert wird. Diese Wechselwirkungen treten bevorzugt bei Testsubstanzen auf, welche aufgrund funktioneller Gruppen wie  $-NH_2$  und  $-OH$  zur Wasserstoffbrückenbildung befähigt sind. Sie zeigen sich einerseits als Adsorption dieser Stoffe an der Innenfläche der Säule, was besonders bei den Materialien Stahl, Aluminium und Kupfer der Fall ist. Deshalb ist zur Erreichung symmetrischer Peaks in derartigen Fällen eine Glassäule vorzuziehen. Andererseits können die zu analysierenden Substanzen von reaktiven Gruppen der Trägermaterialoberfläche gebunden und nur zögernd wieder abgelöst werden. Dies kann vermieden werden, indem man

- die funktionellen Gruppen der Testsubstanzen inaktiviert, z.B. durch Veresterung der Alkohole mit Monocarbonsäureanhydriden von Essig-, Propion- und Buttersäure.
- die mineralischen Verunreinigungen des Trägermaterials durch 'acid'- und/oder 'base-washing' entfernt.
- die Trägermaterialoberfläche durch Silanisierung modifiziert. Besonders wirksam ist hier die Dimethyl-Dichlor-Silan (DMCS)-Behandlung.
- die aktiven Gruppen des Trägermaterials mit der stationären Phase abdeckt. Diese Methode erfordert das Vorhandensein funktioneller Gruppen wie  $-OH$ ,  $-NH_2$ , Ester oder Äther auf der stationären Phase. In diesem Fall ist die Silanisierung des Trägermaterials nicht notwendig. Arbeitet man z.B. mit basischen Substanzen wie Aminen, muß die stationäre Phase zur Inaktivierung des Trägermaterials ebenfalls eine Base enthalten. Oft werden für diesen Zweck KOH in Konzentrationen von 1-2% beige-mischt oder, wenn möglich, Polyäthylenimine als stationäre Phase gewählt.

Wenn die Wahl der stationären Phase nach den oben erläuterten Kriterien von ROHRSCHEIDER (94) und McREYNOLDS (69) vorgenommen wurde, sind Wechselwirkungen zwischen Phase und Proben weitgehend ausgeschlossen. Hier gilt der Grundsatz, daß bei einer stationären Phase mit ähnlichen chemischen Eigenschaften wie die Proben das Tail-ling gewöhnlich am geringsten sein wird.

Schließlich ist es von Zeit zu Zeit notwendig, den Glaswattestopfen am Injektorende der Säule zu erneuern, da sich in ihm Verun-

reinigungen wie Rückstände von Urinextrakten ansammeln, die Ursache für Tailing und Verfälschungen der Retentionszeiten sein können. Außerdem lösen sich permanent geringe Mengen davon wieder aus der Glaswatte und erzeugen im Chromatogramm "Rauschen" und eventuell sogar Störpeaks.

Der Detektor stellt neben der Säuleneinheit ein weiteres wichtiges Funktionssystem eines Gaschromatographen dar. Der zur Spurenanalyse am häufigsten eingesetzte ist der Flammenionisationsdetektor (FID). Er besitzt jedoch nur geringe Spezifität, da er grundsätzlich auf Kohlenwasserstoffe anspricht.

Der Electron Capture Detector (ECD) reagiert nach v. MEYER und HAUCK (72) auf alle elektroneneinfangenden Verbindungen wie Halogene, elementaren Sauerstoff, sauerstoffhaltige Gruppen, Bleialkyle, kondensierte Aromaten, Substanzen mit Nitrogruppen oder Schwefel und Mehrfachbindungen.

Der Thermionic Detector (TID) ist im Prinzip für alle mit der LASSAIGNE-Probe nachweisbaren Elemente empfindlich. Seine Selektivität ist nach AUE et al. (10) abhängig vom Alkalisalz der Kristallperle, der geometrischen Anordnung, den Brenngasen sowie dem Trägergas und der Temperatur. Durch den Rubidiumchlorid-Kristall und entsprechende Wahl der Wasserstoff- und Luftströmungen lassen sich nach v. MEYER (71) stickstoffhaltige Verbindungen mit guter Selektivität (N/C 1:5000) und ausreichender Empfindlichkeit nachweisen. Zudem spricht dieser Detektor auf alle N-Substanzen mit etwa gleicher Empfindlichkeit an, da dies nicht von der Struktur, sondern lediglich von den Stickstoffäquivalenten abhängt.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete NP-FID entspricht in etwa dem TID.

#### 4.2.2. Allgemeine gaschromatographische Arbeitsbedingungen

Zur Verfügung stand der Gaschromatograph HP5830 A der Firma HEWLETT-PACKARD mit Zusatzgerät für den NP-FID und automatischem Probengeber.

Da alle Beta-Blocker eine sekundäre Aminogruppe enthalten, wurde der selektiv stickstoffempfindliche NP-FID Nr. 18847A der Firma HEWLETT-PACKARD eingesetzt. Deshalb wurde statt des üblichen Stick-

stoffs als Trägergas das Helium gewählt, dessen Strömungsgeschwindigkeit auf 20ml/min gehalten wurde. Nach v. MEYER (71) besitzt Helium im Vergleich zu Stickstoff außerdem den Vorteil, daß es die Peakhöhen von N-haltigen Substanzen mindestens auf das Doppelte steigert. Dieser "Nitrogen Phosphorous Flame Ionisation Detector" gehört den geschwindigkeitsabhängigen Modifikationen mit der Funktionsgleichung  $S_2 = a_2 \cdot v_1$  ( $v_1$  in g/sec;  $S_2$ =Signalgröße) an. Er ist mit einem elektrisch heizbaren und im geometrischen Zentrum des Kollektors angeordneten RbCl-Keramikzylinder ausgestattet. Obwohl keine Flamme gezündet wird, entsteht bei relativ niedriger Temperatur um diesen Zylinder ein Plasma, das der Ausrichtung der Ionen und der Dissoziation von organischen Molekülen dient. P- und N-haltige Substanzen bedingen dabei eine enorme Steigerung der Leitfähigkeit dieses Plasmas bis zu einer im Picogrammbereich liegenden Empfindlichkeit (121).

Die Strömungsgeschwindigkeiten der Brenngase Helium und Luft betrugen 3,0-4,5 bzw. 60ml/min. Die Temperaturen des Injektor- bzw. Detektorblocks wurden auf 250 bzw. 300°C programmiert.

Lediglich für die Bestimmung der Retentionsindices (Punkt 4.6.) mußte ein für Kohlenwasserstoffe empfindlicher FID eingebaut werden, da nach KOVATS (60) ausschließlich homologe Alkane als Bezugssubstanzen dienen. Dabei waren auch die Strömungsgeschwindigkeiten der Brenngase zu erhöhen.

Als Säulen wurden 4ft Glassäulen mit 2mm Innendurchmesser und 6" Endenabstand zur 'on column injection' benutzt. Glas besitzt gegenüber Materialien wie Edelstahl, Aluminium und Kupfer wesentliche Vorteile: Zum einen ist es äußerst inert und reduziert somit am stärksten die Wechselwirkungen zwischen reaktiven Gruppen der Testsubstanzen und der Säuleninnenwand, was wiederum den Tailing-Effekt erheblich herabsetzt. Zum anderen besteht der praktische Vorteil der Durchsichtigkeit, so daß sich Menge und Dichte der Säulenfüllung leicht kontrollieren lassen.

#### 4.2.3. Wahl der Packungen und Programme

Trotz der Auswahlhilfen nach ROHRSCHEIDER (94) und McREYNOLDS (69) ist aufgrund der oft nicht ausreichend bekannten Polaritätseigenschaften neuartiger Pharmaka ein gewisses Maß an Empirie unentbehrlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs verschiedene, z.T. erst in den letzten Jahren auf dem Markt erschienene Säulenpackungen auf ihre Tauglichkeit zur Trennung von Beta-Blockern überprüft. Aus Tabelle 7 lassen sich einige wesentliche Merkmale dieser Säulenfüllmaterialien entnehmen.

ULTRABOND ist eine neuartige, in relativ zeitaufwendigem Arbeitsgang hergestellte Phase: Das Trägermaterial Chromosorb W wird mehrere Tage mit kochender Salzsäure gewaschen, anschließend mit Carbowax 20m beschichtet, stickstoffumströmt erhitzt und schließlich einige Tage lang mit Methanol extrahiert. So wird erreicht, daß die Carbowaxphase das Chromosorb W ultradünn und vollständig bedeckt. Daraus resultieren nach Angaben des Herstellers extrem geringes "Säulenbluten", hohe Selektivität, relativ kurze Retentionszeiten, hohe thermische Stabilität und ausgezeichnete Trennung stark polarer Substanzen.

2% OV101 ist eine bewährte, universell verwendbare Methylsilikonphase auf Chromosorb W, HP mit ähnlichen Polaritätseigenschaften wie OV1.

10% APIEZON L/2% IGEPAL ist eine relativ hoch beschichtete Kohlenwasserstoffphase auf Chromosorb W, HP, das mit 10% KOH behandelt wurde. Apiezon hat sich im allgemeinen bei Amphetaminen und verwandten Verbindungen bewährt. Das Igepal fungiert als Tailing-Reducer und verhindert Adsorptionsvorgänge.

3% OV225 ist eine hochpolare Cyanopropyl-Phenylmethyl-Silikonphase mit einem Temperaturlimit von 275°C, die sich besonders zur Chromatographie von Basen eignet. Als Trägermaterial dient Gas Chrom Q.

3% SP2100 DB ist eine bis 250 °C arbeitende reine Methylphenyl-Silikonphase sehr geringer Polarität und vergleichbar mit OV1, OV101 und SE30. Diese Phase wurde in einem Spezialverfahren inaktiviert, um sie für basische Substanzen wie Steroide und Alkaloide geeigneter zu machen. Dadurch wird das Tailing reduziert und die Empfindlichkeit auf Basen wie Beta-Blocker erhöht. Als Trägermaterial dient Supelcoport AW, DMCS.

1% SP1000 ist eine hochpolare Polyäthylenglycolphase mit substituierter Terephthalsäure auf Supelcoport. Sie eignet sich sowohl für Säuren (Fettsäuren) als auch für Basen (Amine).

Schließlich war zu klären, ob Isothermie oder ein Temperaturprogramm den Anforderungen dieser Arbeit besser gerecht werden.

Tabelle 7 : Verwendete Säulenpackungen

| Handelsname                   | Trägermaterial<br>(mesh)          | Beschichtung                                   | McREYNOLDS-Konstanten (AI-Werte) |     |     |     |     |     |     | Lit.          |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
|                               |                                   |                                                | 1                                | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |               |
| ULTRABOND                     | Chromosorb W<br>(100/120)         | Carbowax 20m<br>(Polyäthylenglycol)            | -*                               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -             |
| 2% OV101                      | Chromosorb W, HP                  | Methylsilikon                                  | 017                              | 057 | 045 | 067 | 043 | 033 | 023 | (100)         |
| 10% APIEZON L/<br>2% IGEPAL   | Chromosorb W, HP<br>(80/100)      | Hydrocarbon                                    | -*                               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -             |
| 3% OV225                      | Gas Chrom Q<br>(100/120)          | Cyanopropyl-Phenyl-<br>methylsilikon           | 228                              | 369 | 338 | 492 | 386 | 382 | 150 | (81,<br>103)  |
| 3% SP2100 DB                  | Supelcoport AW,<br>DMCS, (80/100) | Methylphenylsilikon                            | 017                              | 057 | 045 | 067 | 043 | 033 | 023 | (101,<br>103) |
| 1% SP 1000                    | Supelcoport<br>(100/120)          | Carbowax u. substitu-<br>ierte Terephthalsäure | 332                              | 555 | 393 | 583 | 546 | -   | -   | (100)         |
| Absolute RI-Werte auf Squalan |                                   |                                                | 653                              | 590 | 627 | 652 | 699 | 690 | 841 | (100)         |

- 1 Benzol 5 Pyridin
- 2 1-Butanol 6 2-Methyl-2-Pentanol
- 3 2-Pentanon 7 2-Octen
- 4 Nitropropan
- \* Für diese Phase waren in der Literatur keine McREYNOLDS-Konstanten angegeben

Die Eignung der vorgestellten Phasen zur Trennung von Beta-Adrenolytika wurde geprüft, nachdem je 2 µl von äthanolischen Beta-Blocker-Lösungen der Konzentration von 10 µg/ml auf die einzelnen Säulen gegeben worden waren.

Die Tauglichkeit eines Temperaturprogramms wurde bei den Phasen ULTRABOND und 3% SP2100 DB getestet. Der Temperaturbereich betrug 120-230°C, die Heizrate 8°C/min.

#### 4.2.4. Erzielte Trennungen

In Tabelle 8 sind Retentionszeiten und Peakqualitäten der untersuchten Beta-Blocker auf den ausgewählten stationären Phasen zusammengestellt. Die Phase 10% APIEZON L/2% IGEPALE erbrachte aufgrund ihrer starken Polarität und hohen Beschichtung unmeßbar lange Retentionszeiten und war deshalb für diese Untersuchungen ungeeignet.

In Abb. 1 wurden am Beispiel des Beta-Blockers Oxprenolol charakteristische Chromatogramme auf den vorgestellten Phasen aneinandergereiht. Bezüglich der Peakqualität lassen die Phasen ULTRABOND und 2% OV101 bei einigen Substanzen deutliche Mängel erkennen. Da es aber Ziel dieser Arbeit ist, ein möglichst großes Spektrum an Beta-Blockern zu erfassen, mußten diese beiden Säulenpackungen für die Analytik von Reinsubstanzen aus der engeren Wahl gezogen werden.

Die mit den Phasen ULTRABOND und 3% SP2100 DB getesteten Temperaturprogramme ergaben keine besseren Resultate als das Isothermprogramm. Sie führten sogar während der Heizperiode zu einem auffallenden Anstieg der Basislinie, was auf eine temperaturabhängige Schädigung des Säulenfüllmaterials im Sinne des "Säulenblutens" hinweist. Abb. 2 zeigt hierfür einen charakteristischen Vergleich der Chromatogramme des Beta-Blockers Nifenalol auf 3% SP2100 DB bei Temperaturprogramm 120-230°C sowie Isothermie von 200°C. Somit erwies sich das Temperaturprogramm als ungünstig. Da die untersuchten Beta-Blocker ohnehin relativ ähnliche Strukturen und deshalb auch ein engeres Retentionszeitenspektrum besitzen, kann auf ein Temperaturprogramm verzichtet werden. Die für weitere Untersuchungen vorgezogene Isothermie hat zudem den großen labortechnischen

Tabelle 8 : Retentionszeiten und Peakqualitäten der untersuchten Beta-Blocker  
auf den ausgewählten stationären Phasen

| ULTRABOND    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2% OV101  | 10% APIEZON L/ |           | 3% SP2100 DB |           | 3% OV225  | 1% SP1000 |           |
|--------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2% IGEPAL |                |           |              |           |           |           |           |
|              |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 200°C iso | 120-230°C      | 200°C iso | 200°C iso    | 200°C iso | 120-230°C | 220°C iso | 200°C iso |
| Programm-Nr. |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1         | 2              | 3         | 4            | 5         | 6         | 7         | 8         |
| Metipranolol |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | - *       | -              | -         | -            | 6,60      | -         | 8,95      | 12,27     |
| Metoprolol   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2,31 T    | 8,48           | 3,52 T    | -            | 3,40      | 10,96 T   | 3,66      | 5,10      |
| Nifenalol    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 2,23 T    | 9,99 T         | 2,11 T    | -            | 2,39      | 9,63 T    | 4,30      | 5,53      |
| Oxprenolol   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 1,33 T    | 8,69 T         | 2,29 T    | -            | 2,21      | 9,61 T    | 2,29      | 2,92      |
| Toliprolol   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 0,63      | 6,67 T         | 1,22 T    | -            | 1,20      | 7,15 T    | 1,15      | 1,36      |

T Tailing

\* Metipranolol stand zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch nicht zur Verfügung  
und wurde deshalb nur auf den Phasen der engeren Wahl nachgetestet

Abb.1 : Vergleich der Chromatogramme von Oxprenolol auf den in Tabelle 8 angegebenen Phasen bei Isothermprogramm

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V       |
| Trärgas        | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 200 bzw. 220°C (s.Tab.8)   |
| Injektortemp.  | 250°C                      |
| Detektortemp.  | 300°C                      |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |

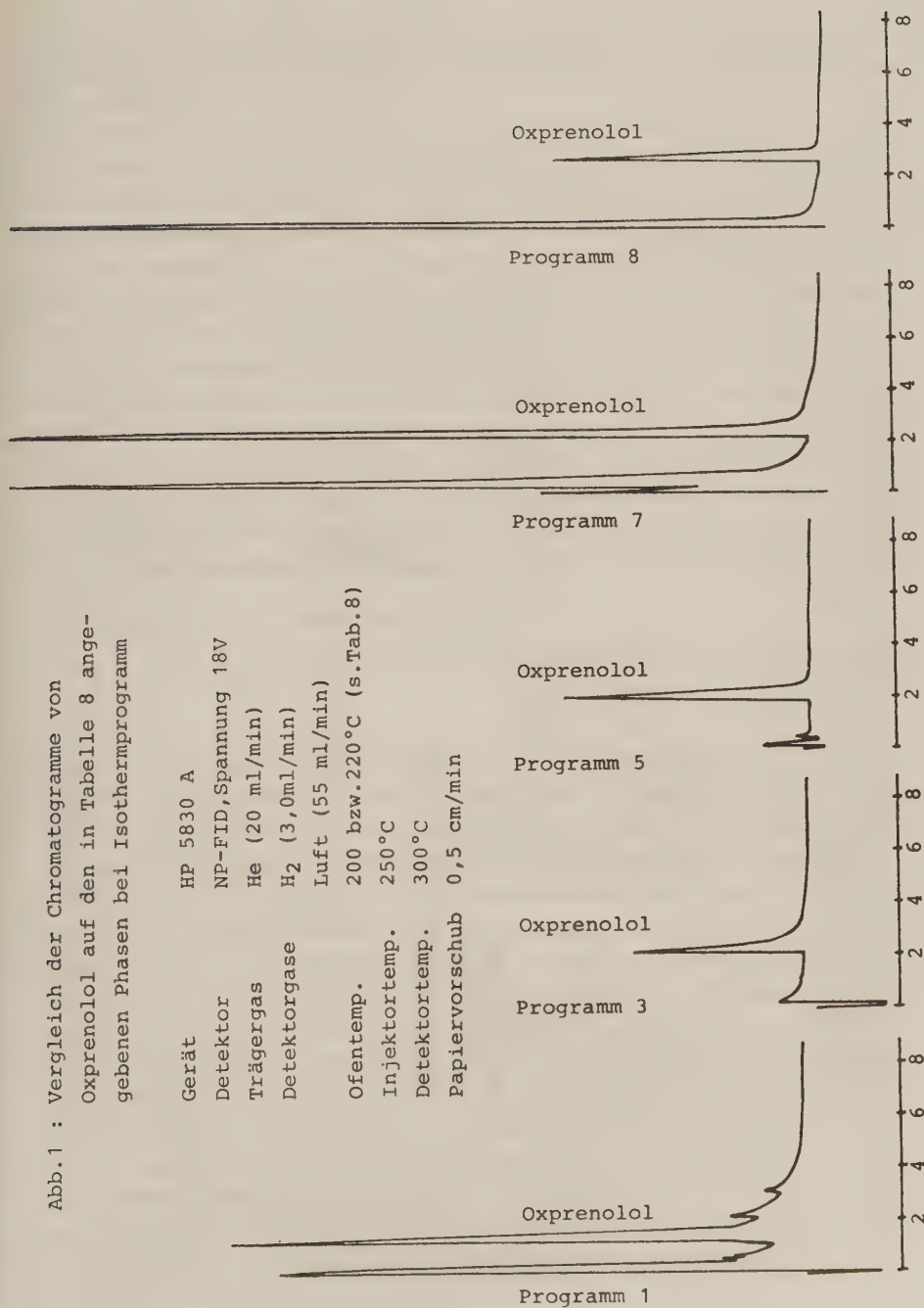
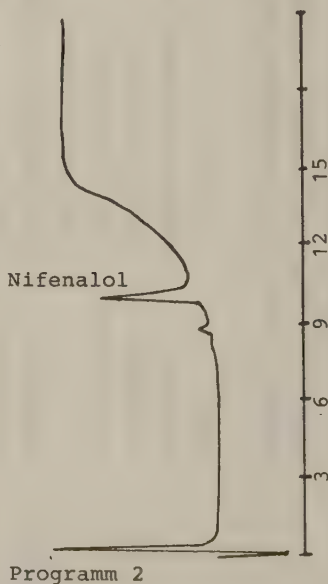
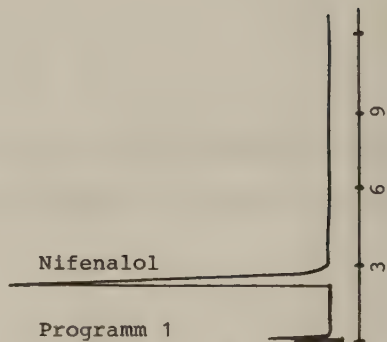


Abb.2 : Vergleich der Chromatogramme des Beta-Blockers Nifenalol auf der stationären Phase 3 $\mu$  SP2100 DB bei Temperaturprogramm 120-230°C und Isothermie von 200°C

|                |                                              |
|----------------|----------------------------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                                    |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V                         |
| Trägergas      | He (20 ml/min)                               |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min)                   |
|                | Luft (55 ml/min)                             |
| Ofentemp.      | 120-230°C, Heizrate 8°C/min ; 200°C isotherm |
| Injektortemp.  | 250°C                                        |
| Detektortemp.  | 300°C                                        |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                                   |



Vorteil der Zeit- und Materialersparnis, da Heiz- und Abkühlperiode entfallen und die Substanzen hier durchwegs kürzere Retentionszeiten haben.

Die Peakqualität und Trennung von Beta-Blocker-Reinsubstanzen auf den Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 werden den gestellten Anforderungen gerecht. Die Trennfähigkeit der Packung 3% SP2100DB schafft lediglich bei der Differenzierung der Beta-Blocker Nifedipin und Oxprenolol Probleme durch zu geringen Unterschied der Retentionszeiten. Bei Verwendung der Phasen 3% OV225 oder 1% SP1000 läßt sich dieser Nachteil vermeiden. Dennoch ist die Packung 3% SP2100 DB aufgrund ihrer guten Peakqualitäten durchaus brauchbar, um in der rechtsmedizinischen Laborpraxis das Vorhandensein eines bekannten Beta-Blockers bestätigen zu können.

Die Trennfähigkeit dieser drei Phasen wird, wie aus den Retentionszeiten in Tabelle 8 bereits ersichtlich, von den folgenden Abbildungen anschaulich dargestellt. Abb. 3 zeigt alle untersuchten Beta-Blocker auf 3% SP2100 DB, Abb. 4 auf 3% OV225 und Abb. 5 auf 1% SP1000.

#### 4.3. Untersuchungen zur Derivatisierung

Sämtliche in dieser Studie untersuchten Beta-Blocker weisen reaktionsfähige Gruppen auf, die zur Adsorption an der Säuleninnenwand, auf dem Trägermaterial sowie der Phase und damit zu Tailing führen können. Um diesbezüglich weitere Verbesserungen zu erzielen, wurden die Beta-Blocker vor der gaschromatographischen Analyse nach Arbeitsvorschrift I mit Propionsäureanhydrid (PSA) in Anlehnung an Autoren wie BROOKS und HORNING (22) verestert, die Reaktionen mit kurzkettigen Monocarbonsäuren beschrieben haben. Die Propionylierung nach KAUERT (56) ermöglicht zudem die Derivatisierung im wässrigen Milieu und damit die gleichzeitige Extraktion und Veresterung der Beta-Blocker. Um die Ausbeute an Beta-Blocker-PSA-Derivaten zu erhöhen, wurde analog KAUERT die PSA-Derivatisierung durch eine Nachderivatisierung mit PSA und Pyridin erweitert. Im Vergleich zur Chromatographie mit Reinsubstanzen waren auf den drei ausgewählten Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 keine wesentlichen Verbesserungen der Peakformen festzustellen.

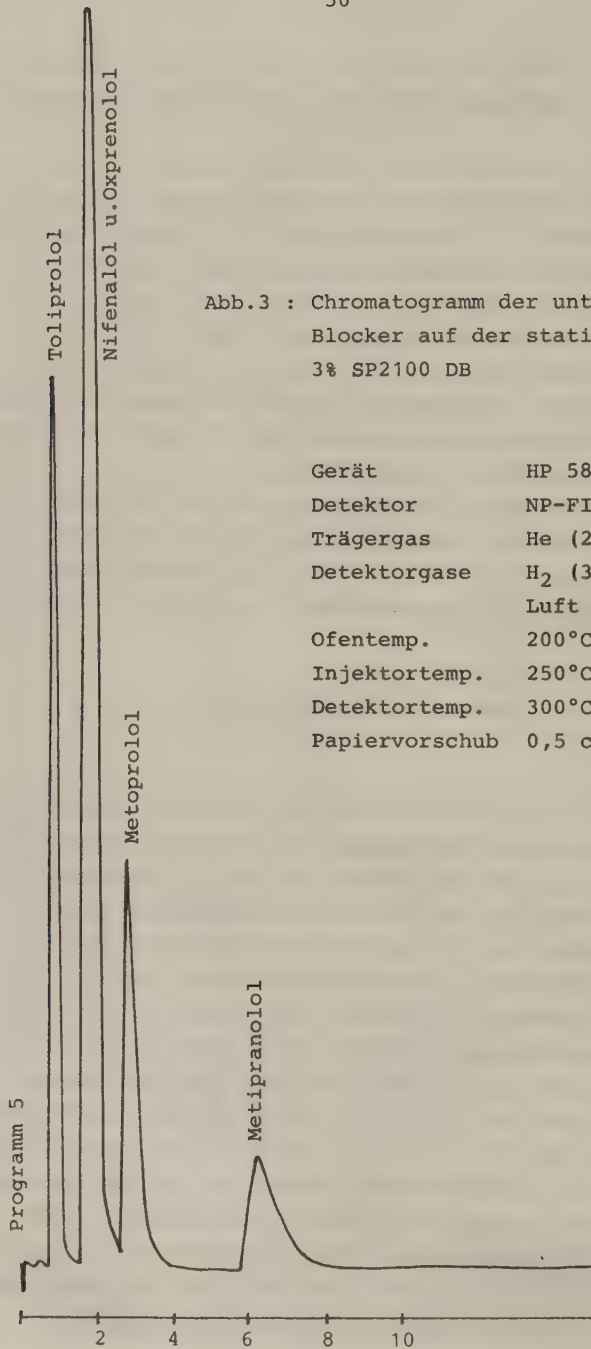


Abb.3 : Chromatogramm der untersuchten Beta-Blocker auf der stationären Phase  
3% SP2100 DB

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V       |
| Trärgas        | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 200°C                      |
| Injektortemp.  | 250°C                      |
| Detektortemp.  | 300°C                      |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |

Abb. 4 : Chromatogramm der untersuchten Beta-Blocker  
auf der stationären Phase 3% OV225

|                |                             |
|----------------|-----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                   |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V        |
| Tränergase     | He (20 ml/min)              |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0 ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)            |
| Ofentemp.      | 220°C                       |
| Injektortemp.  | 250°C                       |
| Detektortemp.  | 300°C                       |
| Papiervorschub | 1,0 cm/min                  |

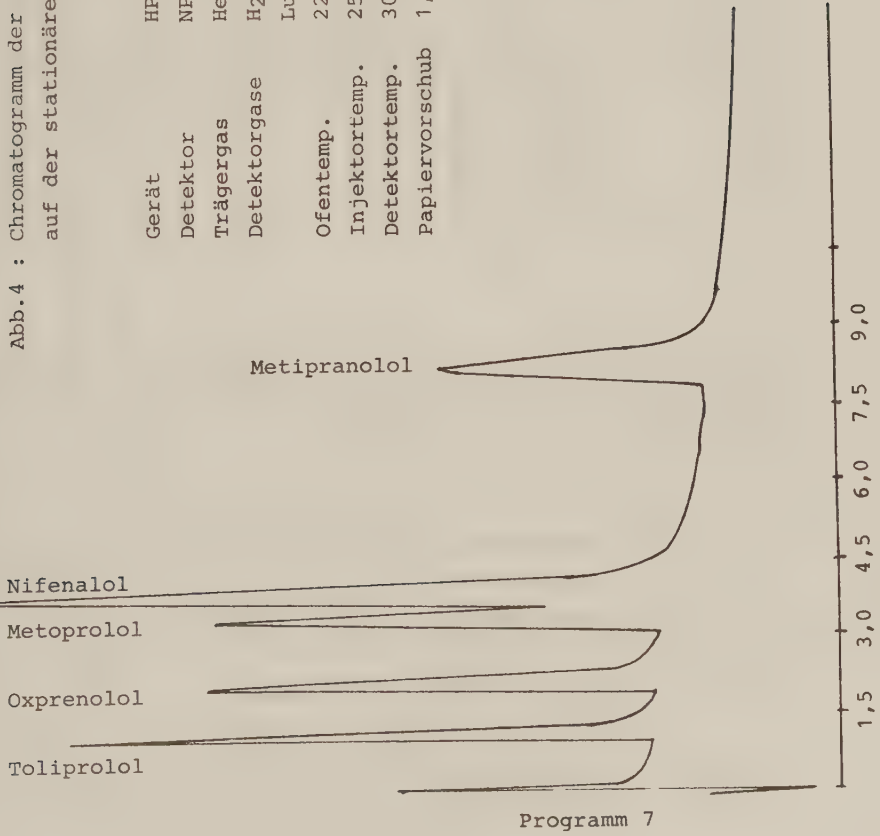


Abb.5 : Chromatogramm der untersuchten Beta-Blocker  
auf der stationären Phase 1% SP1000

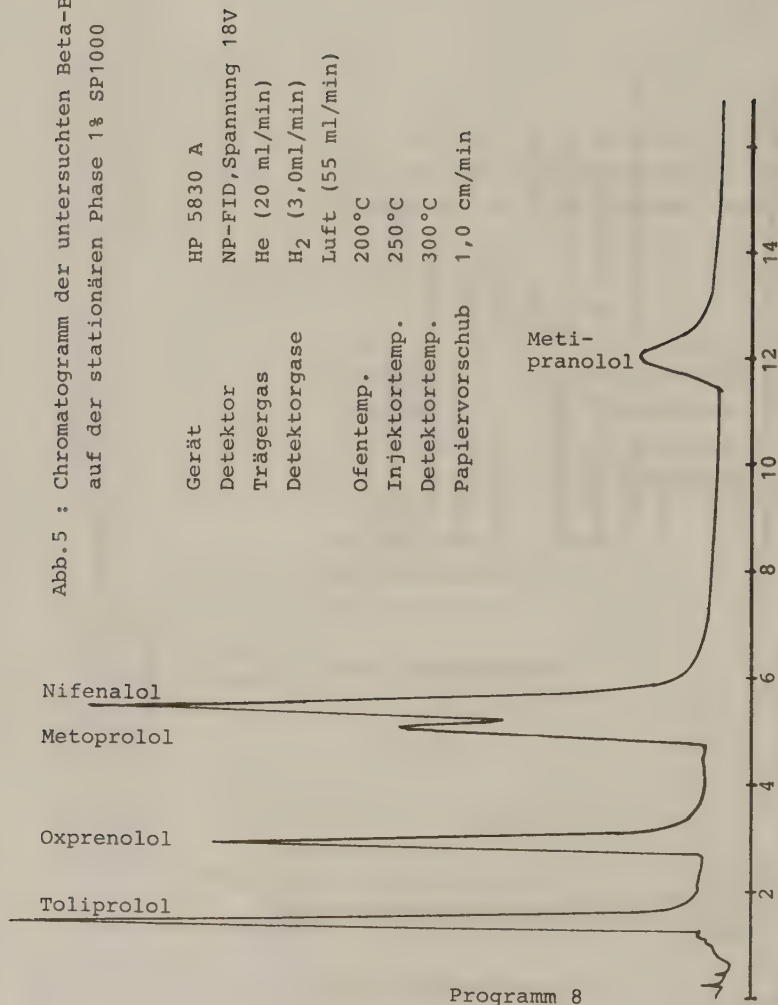


Abb.6 stellt die auf 3% SP2100 DB gewonnenen Chromatogramme des Beta-Blockers Toliprolol und seines PSA-Derivates gegenüber. Abb.7 zeigt denselben Sachverhalt auf 3% OV225.

Weitere Versuche mit derivatisierten Substanzen im Temperaturprogramm 120-230°C auf 3% SP2100 DB und ULTRABOND brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse; sie bestätigten indes nur die bereits beschriebenen Eigenschaften des Temperaturprogramms.

Wie ein Versuch mit Derivaten bei Isothermprogramm auf ULTRABOND bewies, lassen sich hier mit Veresterung durchaus bessere Peakqualitäten erzielen. Da diese jedoch im allgemeinen die Reinsubstanzergebnisse auf 3% SP2100 DB, 3% OV225 oder 1% SP1000 nicht übertreffen, und die Derivatisierung einen labortechnischen Mehraufwand bedeutet, wurde weiterhin auf diesen Arbeitsschritt verzichtet. Zur Sicherung der Identifizierung von Beta-Blockern ist dieses Verfahren jedoch brauchbar.

#### 4.4. Untersuchungen zum Nachweis der Beta-Blocker im biologischen Medium

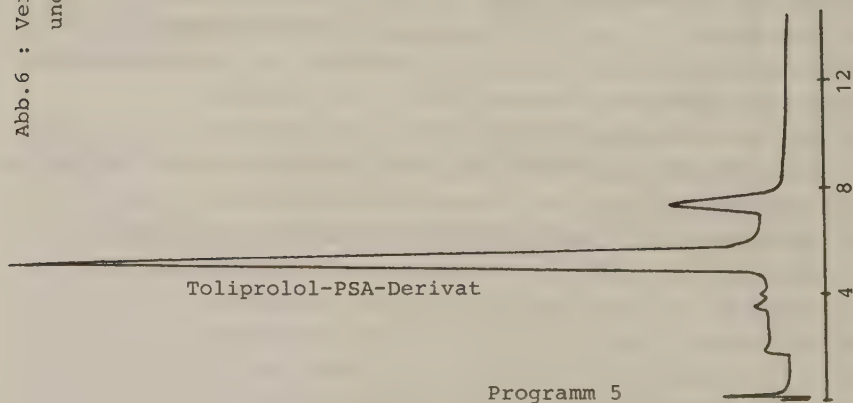
Nachdem in den vorangegangenen Versuchen geklärt worden war, unter welchen gaschromatographischen Bedingungen und in welcher Form die Beta-Blocker in guter Trennung zufriedenstellende Chromatogramme liefern, galt es nun, Nachweismethoden für im biologischen Medium vorhandene Beta-Adrenolytika zu entwickeln.

Wie aus vielen Stoffwechseluntersuchungen hervorgeht, werden Beta-Blocker innerhalb von 24 Stunden fast vollständig über die Nieren ausgeschieden. Aufgrund der starken Metabolisierung erscheint in der Regel nur etwa 1% der Dosis als Reinsubstanz im Urin.

Im Blutplasma hingegen liegen die Beta-Blocker zwar zu einem höheren Prozentsatz unmetabolisiert, jedoch insgesamt in einer zehnfach geringeren Konzentration an Reinsubstanzen als im Urin vor. Es ergeben sich weiterhin die Probleme, daß die Reinsubstanzen zum Teil einer Proteinbindung und ihre ohnehin geringen Konzentrationen starken Schwankungen je nach Zeitpunkt der Blutentnahme unterliegen.

Somit wurde unter dem Aspekt der höheren Konzentrationen von un-

Abb.6 : Vergleich der Chromatogramme des Toliprolol-PSA-Derivats  
und der Reinsubstanz auf der stationären Phase 3% SP2100 DB



Gerät HP 5830 A  
 Detektor NP-FID, Spannung 18V  
 Trägergas He (20 ml/min)  
 Detektorgase H<sub>2</sub> (3,0ml/min)  
 Luft (55 ml/min)  
 Ofentemp. 200°C  
 Injektortemp. 250°C  
 Detektortemp. 300°C  
 Papiervorschub 0,5 cm/min

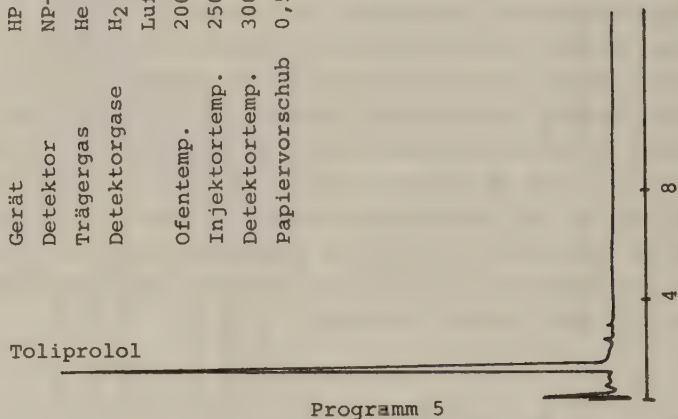


Abb. 7 : Vergleich der Chromatogramme des Toliprolol-PSA-Derivats und der Reinsubstanz auf der stationären Phase 3% OV225

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V       |
| Trärgas        | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 220°C                      |
| Injektortemp.  | 250°C                      |
| Detektortemp.  | 300°C                      |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |

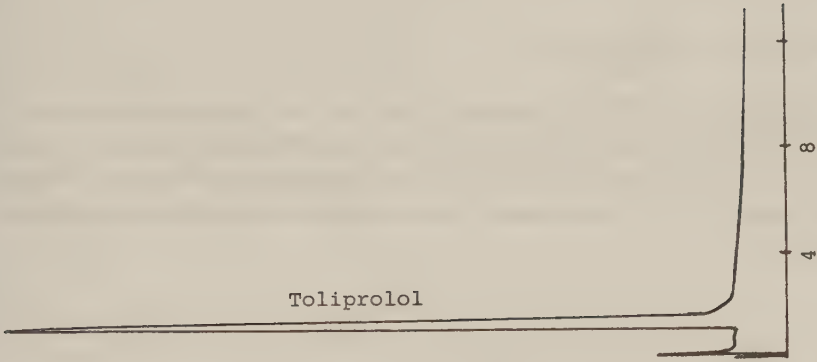
Toliprolol-PSA-Derivat

Programm 7



Toliprolol

Programm 7



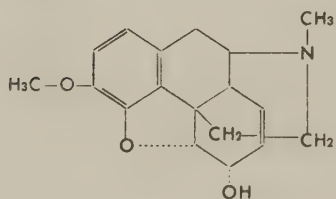
metabolisierten Beta-Blockern eine Extraktionsmethode aus dem biologischen Medium Urin entwickelt.

#### 4.4.1. Arbeitsbedingungen

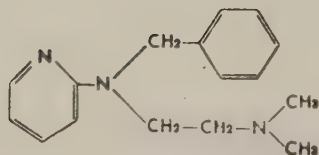
Im Hinblick auf die gute Peakqualität und die günstigen Elutionseigenschaften bei Beta-Blockern wurde die Säulenpackung 3% SP2100DB gewählt. Die Ofentemperatur betrug 180°C. Weitere Bedingungen siehe unter Punkt 4.2.2. "Allgemeine gaschromatographische Arbeitsbedingungen".

#### 4.4.2. Wahl des internen Standards

Codeinphosphat erwies sich als zu polar und hochmolekular, um bei den für die Beta-Blocker gewählten Arbeitstemperaturen auf 3% SP2100 DB zu annehmbaren Retentionszeiten zu erscheinen.



Codein (INN)



Tripelenamin (INN)

So wurde das Tripelenamin (INN), ein Antihistaminikum der Äthylen-diaminreihe mit zwei aromatischen Ringen und zwei basischen tertiären Aminogruppen erfolgreich getestet. Da diese Substanz nur wenig polare Gruppen enthält, wird damit ihr höheres Molekulargewicht

ausgeglichen, sodaß ihre Retentionszeit beim Durchschnitt der Beta-Blocker liegt, wie es für innere Standards allgemein empfohlen wird. Zunächst wurde für die Versuche unter Punkt 4.4.3. generell Tripelelamin als interner Standard verwendet. In den Fällen, wo sich die Peaks der Beta-Blocker und des Tripelenamin überlagert hätten, wurden – wie auch häufig in der Literatur beschrieben – die Beta-Blocker gegenseitig als Standardsubstanzen eingesetzt. So diente der Beta-Blocker Bunitrolol, der in einer entsprechenden Dissertation von RIEDL (91) untersucht wurde, für Nifenalol und Oxprenolol als interner Standard.

#### 4.4.3. Untersuchungen zur selektiven Extraktion von Beta-Blockern aus Urin

Um unmetabolisierte Beta-Blocker mit dem entwickelten gaschromatographischen Verfahren im Urin nachweisen zu können, ist es notwendig, diese Wirkstoffe zuerst möglichst selektiv extrahieren zu können.

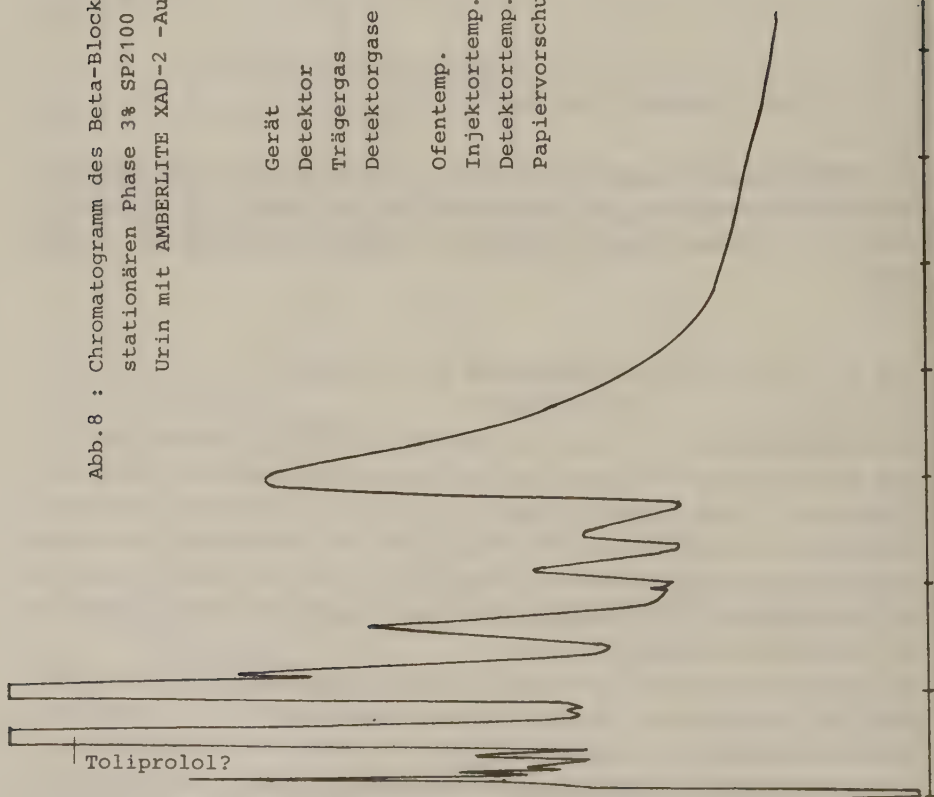
##### 4.4.3.1. Extraktion mit AMBERLITE XAD-2 -Säulen

Die AMBERLITE XAD-2 -Säulen enthalten ein nicht-ionogenes, durch VAN DER WAALSsche Kräfte wirkendes Austauschharz und finden allgemein als 'drug screen' System Verwendung. Nach Arbeitsvorschrift II wurden dem pharmakafreien Normalurin vor der Extraktion Beta-Blocker und Tripelenaminstandard zugefügt. Der Extrakt wurde zur Trockne eingengt und anschließend zur gaschromatographischen Analyse in n-Propanol aufgenommen.

Da keine Selektivität des XAD-2 -Austauscherharzes für Beta-Blocker vorliegt, aufgrund dessen ein sehr hoher Anteil von störenden Begleitsubstanzen mitextrahiert wurde, ergaben sich im Chromatogramm trotz guter Ausbeuten an Beta-Blockern zahlreiche Überlagerungen bis zur undefinierbarkeit einzelner Beta-Blocker-Peaks, was Abb. 8 für die Extraktion von Toliprolol enthaltendem Urin demonstriert. Die Retentionszeit z.B. von Toliprolol betrug unter den angegebenen Bedingungen (180°C Ofentemperatur) 2,15 min. Zu dieser

Abb.8 : Chromatogramm des Beta-Blockers Toliprolol auf der stationären Phase 3% SP2100 DB nach Extraktion aus Urin mit AMBERLITE XAD-2 -Austauscherharz

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V       |
| Trägergas      | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 180 °C                     |
| Injektortemp.  | 250 °C                     |
| Detektortemp.  | 300 °C                     |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |



Zeit erschien jedoch auch in allen anderen Chromatogrammen nach XAD-2 -Extraktion ein nur wenig kleinerer Peak, sodaß es unmöglich ist, das Signal bei 2,15min dem Beta-Blocker Toliprolol zuzuordnen. Außerdem ist der Tripelenaminstandard mit einer Retentionszeit von 5,40min bei 180°C Säulentemperatur nach dem XAD-2 -Verfahren nicht im Chromatogramm auffindbar, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß Tripelenamin durch mitextrahierte Verunreinigungen überlagert worden ist.

#### 4.4.3.2. Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)

Da die Extraktion mit XAD-2 'drug screen' System zu keinem befriedigenden Ergebnis führte, wurde analog v.MEYER (71) ein Extraktionsgang auf der Basis einer Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)-Mischung entwickelt. Da Beta-Blocker polarer als Petroleumbenzin sind, wurden zur Erlangung höherer Ausbeuten 5% 2-Methylbutanol(1) zugesetzt. Außerdem würden die Beta-Adrenolytika ohne einen polaren Zusatz wie 2-Methylbutanol(1) beim Eindampfen des Extrakts z.T. nahezu irreversibel an der polaren Glaswand adsorbiert, was bereits WALLE und EHRSSON (111) sowie DILL und GLAZKO (31) beschrieben haben.

In der hierfür entwickelten Arbeitsvorschrift III wurden ebenfalls Beta-Blocker und Tripelenaminstandard vor der Extraktion zugefügt. Der zur Trockne eingeeengte Überstand wurde in 0,5ml Äthanol gelöst und zur gaschromatographischen Untersuchung eingesetzt. Ein beispielhaftes Chromatogramm zeigt Abb.9 für den Beta-Blocker Toliprolol. Auffallend dabei ist eine ungewöhnlich hohe Selektivität dieser Extraktionsmethode für Beta-Blocker, wie dies auch v.MEYER (71) bei den Antihistaminika feststellen konnte. Die in den XAD-2 -Chromatogrammen vorhandenen Störpeaks traten nach diesem Ausschüttelverfahren nicht in Erscheinung. Sowohl Tripelenamin als auch die Beta-Blocker wurden mit brauchbaren Ausbeuten extrahiert.

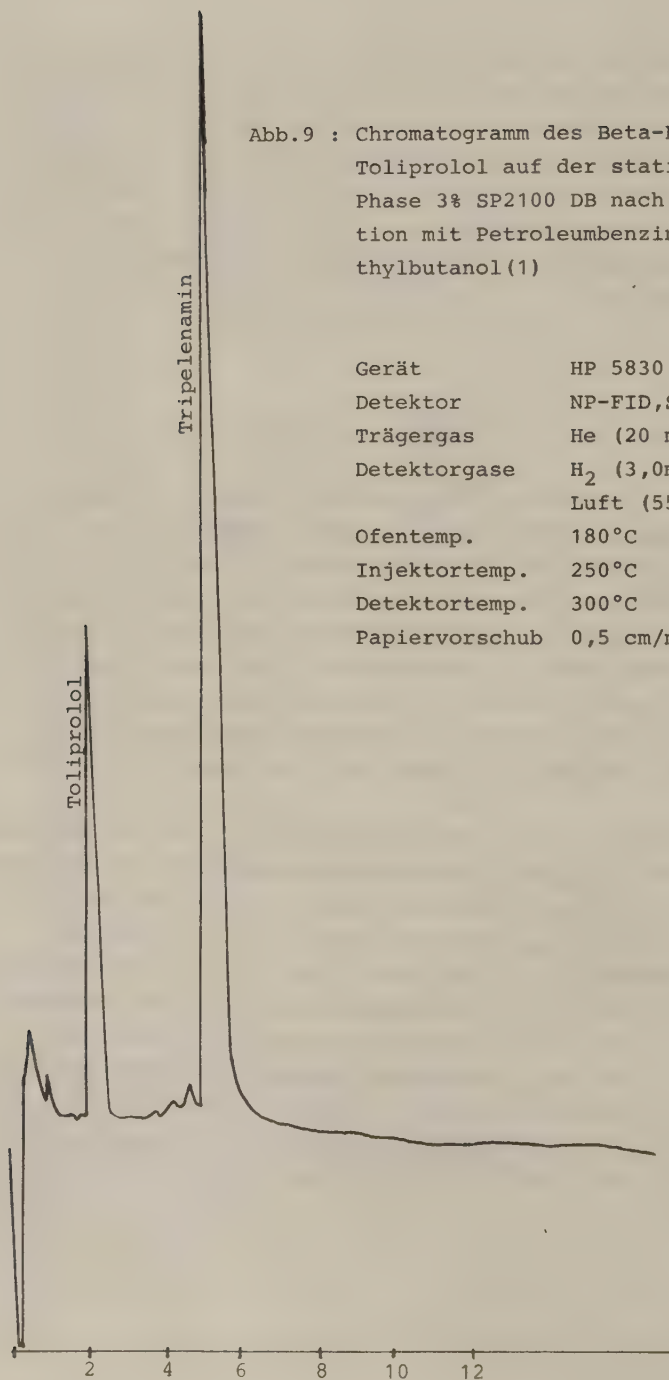


Abb.9 : Chromatogramm des Beta-Blockers Toliprolol auf der stationären Phase 3% SP2100 DB nach Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol (1)

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 18V       |
| Trärgas        | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (3,0ml/min) |
|                | Luft (55 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 180°C                      |
| Injektortemp.  | 250°C                      |
| Detektortemp.  | 300°C                      |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |

#### 4.4.4. Versuche zur Optimierung der Ausbeute

Nachdem mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) ein ausgezeichnetes Extraktionsmittel gefunden worden war, galt es nun, auf den Durchschnitt der Beta-Blocker optimierte Extraktionsbedingungen für maximale Ausbeuten zu entwickeln.

Zunächst wurde dies nach Arbeitsvorschrift IV durch Variation des Mengenverhältnisses von Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) von ursprünglich 95:5 auf 80:20, 70:30 und 60:40 versucht. Dabei wurde der Tripelenamin- bzw. Beta-Blocker-Standard erst nach der Extraktion hinzugefügt. Die Mengen der Standardsubstanzen wurden entsprechend ihrer Stickstoffäquivalente und daraus resultierenden Peakgrößen empirisch bestimmt.

Als weiterer Parameter zur Optimierung der Ausbeute wurde der pH-Wert der Urinprobe herangezogen. Da im allgemeinen pH 9,5 als günstigster Wert für die Extraktion von Aminen gilt, wurde die Untersuchung bei den pH-Werten 8,5, 9,5 und 10,5 durchgeführt. Nachdem in einigen Vorversuchen bei pH 9,5 unter Verwendung des  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffers ein unerwartetes Abfallen der Ausbeute im Vergleich zu den mit reinem  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -System eingestellten pH-Werten von 8,5 und 10,5 zu verzeichnen war, wurde für diese Untersuchungen nach Arbeitsvorschrift V ausschließlich das  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -System benutzt. Die entsprechenden Standards wurden ebenfalls erst nach der Extraktion zugefügt.

Die Ermittlung der Ausbeuten wurde folgendermaßen durchgeführt : Nach Arbeitsvorschrift VI wurden Beta-Blocker und Standardsubstanz im gleichen Mengenverhältnis wie in den Arbeitsvorschriften IV und V in Äthanol gelöst und gaschromatographisch ausgewertet. Der Quotient aus Peakhöhe des nichtextrahierten Beta-Blockers zur Peakhöhe des Standards entspricht dann einer Ausbeute von 100%. Daraufhin wurden die Peakhöhen von Beta-Blocker und Standard aus jedem Chromatogramm der Versuche nach Arbeitsvorschrift IV und V ermittelt und jeweils der Quotient aus Peakhöhe des extrahierten Beta-Blockers zur Peakhöhe des Standards gebildet. Dieser Wert wurde in prozentuale Relation zu dem Quotienten der 100%-Ausbeute gesetzt. In Tabelle 9 sind alle Ausbeuteergebnisse in Prozent der ursprünglich im Urin enthaltenen Menge aufgelistet. Alle Werte sind aus durchschnittlich  $\pm 5\%$  schwankenden Doppelbestimmungen gemittelt.

Tabelle 9 : Ausbeute in Prozent der zugegebenen Menge

| Beta-Blocker | Standard     | Extraktionsmittelmischun-<br>gen bei $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -<br>Puffer pH 9,5 |     |             |             | pH-Änderungen mit $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer bei<br>Extraktionsmittelmischung 70:30 |             |             |      |
|--------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|------|
|              |              | INN                                                                                             | INN | 80:20       | 70:30       | 60:40                                                                                               | 8,5         | 9,5         | 10,5 |
| Metipranolol | Tripelenamin |                                                                                                 |     | 38,6        | <u>55,4</u> | 45,6                                                                                                | <u>25,6</u> | 23,7        | 19,0 |
| Metoprolol   | Tripelenamin |                                                                                                 |     | 15,7        | <u>23,9</u> | 11,5                                                                                                | 37,5        | <u>49,6</u> | 47,1 |
| Nifenalol    | Bunitrolol   |                                                                                                 |     | <u>25,4</u> | 21,3        | -                                                                                                   | 62,7        | <u>98,7</u> | 88,8 |
| Oxprenolol   | Bunitrolol   |                                                                                                 |     | 29,5        | <u>36,0</u> | 18,3                                                                                                | 59,0        | <u>76,5</u> | 64,7 |
| Toliprolol   | Tripelenamin |                                                                                                 |     | 3,3         | <u>3,4</u>  | 2,9                                                                                                 | <u>58,3</u> | 56,3        | 35,9 |

Die besten Werte sind durch Unterstreichung hervorgehoben

Für einige Beta-Blocker wären über die Variationsgrenzen hinausgehende Extraktionsbedingungen günstiger. Da es aber Ziel dieser Arbeit ist, ein möglichst großes Spektrum an Beta-Blockern erfassen zu können, stellen die Extraktionsmittelmischung 70:30 und der pH von 9,5 eindeutig die günstigsten Bedingungen dar. Die in den Rubriken 70:30 und pH 9,5 unterschiedlichen Werte zeigen zudem, daß – ausgenommen bei Metipranolol – mit ausschließlicher Pufferung durch das  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -System etwa dreifach höhere Ausbeuten zu erzielen sind als mit dem  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -System. Bei Toliprolol macht sich dieser Effekt besonders stark bemerkbar. Dabei ist nicht zu vergessen, daß durch die salzsaure Konservierung des Normalurins und anschließende Alkalisierung mit konzentrierter Ammoniaklösung auch bei Verwendung des Hydrogencarbonatpuffers stets eine gewisse Menge an  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -System vorhanden ist (siehe Einleitung zu den "Arbeitsvorschriften" unter Punkt 4.8.).

#### 4.5. Versuche zur Aufstellung der Eichgeraden

Die Aufstellung der Eichgeraden von zu untersuchenden Substanzen dient folgendem Zweck: Die Eichgerade ermöglicht die statistische Fundierung der Proportionalität zwischen Konzentration der Testsubstanz und Größe des Detektorsignals. Dies erlaubt Rückschlüsse von der Höhe des Detektorsignals auf die Konzentration der Testsubstanz.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, bewegen sich die Konzentrationen von unmetabolisierten Beta-Blockern im Urin zwischen 0,1 und maximal 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Deshalb wurden 0,1, 0,3, 0,5, 1,0 und 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  als vorgegebene Konzentrationen der Beta-Blocker im Urin zur Ermittlung der Eichgeraden gewählt.

##### 4.5.1. Arbeitsbedingungen

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf der stationären Phase 3% SP2100 DB bei isothermen Bedingungen von 200°C durchgeführt. Um wegen der relativ geringen Konzentration an Beta-Blockern

eine hohe Detektorempfindlichkeit zu erhalten, wurden 20V als Dauerspannung eingestellt, wofür eine  $H_2$ -Strömung von 4,5ml/min und eine Luftzufuhr von 60ml/min nötig waren. Die internen Standards blieben wie in Tabelle 9 angegeben. Weitere Bedingungen lassen sich dem Punkt 4.2.2. entnehmen.

#### 4.5.2. Arbeitsmethode

Da die mit dem Hydrogencarbonatpuffer erzielte Ausbeute an Beta-Blockern der Empfindlichkeit des NP-FID selbst für geringste Konzentrationen von 0,1µg/ml Urin genügte, wurde weiterhin das  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ -System zur Pufferung verwendet. Ferner wurde mit der Extraktionsmittelmischung Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) 70:30 und einem pH von 9,5 gearbeitet.

Nach Arbeitsvorschrift VII wurden in Doppelbestimmungen dem Normalurin steigende Mengen an Beta-Blocker zu den oben angegebenen Konzentrationen und die entsprechenden inneren Standards zugegeben. Der Extrakt wurde nach dem Abdampfen in 50µl Äthanol gelöst, von denen jeweils 2-3µl der gaschromatographischen Analyse zugeführt wurden.

Aus den Doppelbestimmungen ergab sich für jede vorgegebene Konzentration 'x' eines Beta-Blockers ein Quotienten-Paar ' $y$ =Peakhöhe des Beta-Blockers : Peakhöhe des Standards', also letztlich 2x5 Wertepaare (x,y) für jede Eichgerade ' $y=A_1+B_1x$ ' ( $A_1$ =Achsenabschnitt der Geraden,  $B_1$ =Steigung). Die Berechnung der Eichgeradenkonstanten  $A_1$  und  $B_1$  nach linearer Regression erfolgt so, daß die Summe der Abstandskquadrate der y-Werte von der Eichgeraden ein Minimum wird. In Tabelle 10 wurden neben den Konstanten  $A_1$  und  $B_1$  und den Korrelationskoeffizienten aller Geraden auch die Konstanten  $A_2$  und  $B_2$  der Umkehrfunktion ' $x=A_2+B_2y$ ' aufgelistet.

Tabelle 10 : Eichgeradenkonstanten und Korrelationskoeffizienten

| Beta-Blocker<br>INN | Standard<br>INN | A <sub>1</sub> | B <sub>1</sub> | Korrelations-<br>koeffizient | A <sub>2</sub> | B <sub>2</sub> |
|---------------------|-----------------|----------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|
| Metipranolol        | Triipelenamin   | -0,7307        | 0,5454         | 0,9830                       | 1,4970         | 1,7716         |
| Metoprolol          | Triipelenamin   | -0,1314        | 9,1148         | 0,9739                       | 1,6983         | 10,4059        |
| Nifenalol           | Bunitrolol      | 0,7085         | 0,1664         | 0,9953                       | -4,1368        | 5,9519         |
| Oxprenolol          | Bunitrolol      | -9,3775        | 3,9264         | 0,9996                       | 0,2446         | 25,4494        |
| Toliprolol          | Triipelenamin   | -0,2694        | 0,2812         | 0,9715                       | 1,2972         | 3,3573         |

#### 4.6. Berechnung der Retentionsindices nach KOVATS für die Phasen 3%SP2100DB, 3%OV225 und 1%SP1000

Angesichts der stetig steigenden Zahl der bei toxikologischen Analysen zu erwartenden Verbindungen war es für ein einzelnes Labor nicht möglich, die notwendigen gaschromatographischen Daten für alle diese Stoffe selbst zu erarbeiten. Daher mußte ein Weg gefunden werden, solche Daten austauschbar zu erstellen. Dazu war eine Standardisierung erforderlich. Die beste Möglichkeit hierfür stellen die von KOVATS (60) bereits 1958 vorgeschlagenen Retentionsindices (RI) dar, die nach BERNINGER und MÖLLER (16) zusätzlich zur Identifizierung von Arzneimitteln herangezogen werden können.

##### 4.6.1. Theorie und Definition der Retentionsindices nach KOVATS

Da die Verwendung der RI nach KOVATS noch nicht sehr verbreitet ist, wird an dieser Stelle kurz auf ihre Theorie und Definition in Anlehnung an BERNINGER und MÖLLER (16) eingegangen.

Als Bezug dienen die Retentionszeiten der n-Alkane, womit der gesamte Bereich der gaschromatographisch flüchtigen Substanzen erfaßt wird. Durch Einsetzen der Logarithmen dieser Retentionszeiten erhält man eine lineare Skala, auf der die Bezugspunkte jeweils gleichen Abstand voneinander haben. Jedem n-Alkan wird ein Wert zugeordnet, der aus der Anzahl seiner Kohlenstoffatome multipliziert mit 100 resultiert. Dieser Wert ist als Retentionsindex definiert. Den RI einer beliebigen Verbindung erhält man durch lineare Interpolation zwischen den nächstliegenden Alkanen, zwischen denen diese Verbindung im Gaschromatogramm erscheint. Die Berechnung erfolgt nach der einfachen Formel :

$$RI_x = (I_2 - I_1) \frac{\lg(t'_x/t'_1)}{\lg(t'_2/t'_1)} + I_1$$

$RI_x$  = Retentionsindex der Substanz x

$I_1$  = RI des nächstniederen n-Alkans

$I_2$  = RI des nächsthöheren n-Alkans

$t'_x$  = Netto-retentionszeit der Substanz x

$t'_1$  = Netto-Ret.zeit des  
nächstnied. n-Alkans

$t'_2$  = Netto-Ret.zeit des  
nächsthöh. n-Alkans

Dabei ist zu beachten, daß die Nettoretentionszeit  $t'_x$  erhalten wird durch Subtraktion der "Totzeit"  $t_m$  von der im Chromatogramm abzulesenden Bruttoretentionszeit  $t_x$ . Dieses Zeitintervall  $t_m$  – auch Durchbruchzeit genannt – entspricht einer Substanz wie Methan, die praktisch nicht von der Säulenfüllung zurückgehalten wird und in dieser Zeit den Weg vom Einspritzblock zum Detektor zurücklegt. Als Basis benutzt man nach MACHATA (66) die Bruttoretentionszeiten von drei benachbarten n-Alkanen, z.B.  $C_{14}$ ,  $C_{16}$  und  $C_{18}$  oder  $C_{14}$ ,  $C_{15}$  und  $C_{16}$ . Die Formel zur Berechnung der Totzeit stammt von PETERSON und HIRSCH (83) und lautet :

$$t_m = \frac{t_x \cdot t_z - t_y^2}{t_x + t_z - 2t_y}$$

$t_x, t_y, t_z$  = Bruttoretentionszeiten

von drei benachbarten n-Alkanen mit gleichen  
C-Differenzen

Die Retentionsindices sind demnach in einem System der n-Alkane normalisierte gaschromatographische Laufzeiten, die für isotherme Verhältnisse definiert sind. Sie sind weitgehend unabhängig von der Geschwindigkeit des Trägergases, der Säulenlänge und Dichte ihrer Packung. Es besteht jedoch eine Abhängigkeit von der Temperatur und natürlich eine Retentionsindex-Spezifität für das verwendete Säulenmaterial.

Als erste veröffentlichten KAZYAK und PERMISOHN (57) im Jahre 1970 eine Datei der RI von Arzneimitteln. Inzwischen sind noch mehrere Arbeiten dieser Art, z.B. von CADDY et al. (25) erschienen. Die umfangreichste Darstellung gibt MOFFAT (76) im Jahre 1975, der die RI von 480 für die toxikologische Analyse relevanten Substanzen auf einer Säule (SE30) mitteilt. Nach BERNINGER und MÖLLER (16) ist die Auswertung dieser Daten jedoch eingeschränkt, da – CADDY et al. ausgenommen – keine Arbeitstemperaturen angegeben sind.

Bei der Vielzahl der in Frage kommenden Substanzen sowie einer gewissen Häufung der RI-Werte auf einer Säule ist eine einzige RI-Angabe für die sichere Identifizierung nicht ausreichend, da der gefundene Wert häufig mehreren Substanzen zugeordnet werden kann. BERNINGER et al. (15) und MOFFAT (76) ermittelten nämlich durchschnittliche Abweichungen zwischen verschiedenen Laboratorien von 16 (4–34) RI-Einheiten und Standardabweichungen innerhalb eines Labors von durchschnittlich 4 RI-Einheiten.

Deshalb bestimmt man zur eindeutigen Identifikation die RI der einzelnen Substanzen auf verschiedenen stationären Phasen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften. Durch geeignete Auswahl mehrerer Säulen kann eine für jede Substanz charakteristische Kombination erhalten werden, welche die Aussagekraft der gaschromatographischen Analyse wesentlich steigert. Die Auswahl der in Betracht zu ziehenden Trennmaterialien erfolgt nicht rein empirisch. Wie bereits unter Punkt 4.2.1. erwähnt, hat ROHRSCHEIDER (94) in Umkehrung des Prinzips von KOVATS die RI einfacher Substanzen aus typischen Stoffgruppen (s. Tabelle 6) dazu benutzt, die Trenneigenschaften der verschiedenen Säulenfüllmaterialien zu charakterisieren. Dieser Gedanke wurde von McREYNOLDS (69) weitergeführt, der die vorzugsweise benutzten Materialien tabellarisch erfaßte. Mittels dieser McREYNOLDS-Konstanten, sofern von den Herstellern angegeben, ist es möglich, für ein bestimmtes Säulenmaterial vorauszusagen, inwieweit es sich von einem anderen unterscheidet und ob es für spezielle Trennprobleme geeignet ist.

#### 4.6.2. Arbeitsbedingungen

Die RI der in dieser Arbeit untersuchten Beta-Blocker wurden auf den drei Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 bestimmt. Wie bereits unter Punkt 4.2.2. erwähnt, mußte zu diesem Zweck wegen der nicht stickstoffhaltigen Alkane statt des sonst eingebauten NP-FID ein konventioneller FID verwendet werden, der auf CH-Gruppen anspricht. Die Nachweisgrenze dieses Detektors liegt für stickstoffhaltige Substanzen etwa um den Faktor 10 höher als die des NP-FID. Deshalb mußten die Konzentrationen von Beta-Blockern, Tripelamin und n-Alkanen entsprechend erhöht werden.

Die Zündspannung des FID betrug 20V, die Brenngase Wasserstoff und Luft mußten auf 45ml/min bzw. 200ml/min gesteigert werden. Der Helium-Flow wurde bei 20ml/min belassen.

Die isotherme Ofentemperatur des Gaschromatographen HP 5830 A betrug bei 3% SP2100 DB und 1% SP1000 200°C, bei 3% OV225 220°C, die Temperatur des Einspritzblocks 250°C und die des Detektors 300°C. Bei der Phase 3% SP2100 DB überdeckte das n-Alkan-Gemisch  $C_{16}, C_{18}, C_{20}, C_{22}, C_{24}$  den Bereich der Beta-Blocker-Retentionszeiten, bei

3% OV225 war hierzu die Reihe aus  $C_{22}, C_{24}, C_{28}, C_{32}, C_{36}$  nötig, während für 1% SP1000 die Mischung  $C_{24}, C_{28}, C_{32}, C_{36}$  benutzt wurde.

#### 4.6.3. Arbeitsmethode

Die n-Alkane wurden unter Erwärmung auf 50-60°C in n-Hexan gelöst. Ihre Konzentrationen betragen ebenso wie die der Beta-Blocker und des Tripelenamin 1mg/ml. Beta-Blocker und Standard wurden vor der gaschromatographischen Untersuchung in Äthanol aufgenommen, da wässrige Lösungen das Säulenfüllmaterial schädigen können. In Fünffachbestimmung wurden je 2µl des geeigneten Alkangemisches, der Beta-Blocker- und Standard-Lösungen der gaschromatographischen Analyse zugeführt.

Die Retentionszeiten der n-Alkan-Gemische, Beta-Blocker und der Standards wurden in Fünffachbestimmung ermittelt, und – sofern sie nicht identisch waren – der Durchschnittswert gebildet.

In Tabelle 11 wurden Retentionszeiten und RI sämtlicher untersuchten Substanzen einschließlich der Alkane auf den verwendeten Phasen unter Angabe der Säulentemperaturen zusammengestellt.

Die RI lassen sich natürlich auf zeitraubende Weise mit Hilfe einer Logarithmentabelle ermitteln. Einfacher jedoch ist deren Bestimmung graphisch nach der Methode von HUPE (48) : man trägt auf einem halblogarithmischen Millimeterpapier auf die Ordinate die mit 100 multiplizierten C-Zahlen der Kohlenwasserstoffe und auf der logarithmisch geteilten Abszisse die Nettoretentionszeiten ein. Eine Inter- oder Extrapolation der RI der gesuchten Substanzen ist mit mäßiger Genauigkeit, die aber für viele Zwecke ausreicht, möglich. Falls jedoch ein programmierbarer Taschenrechner wie der HP 65 zur Verfügung steht, ist die Bestimmung der RI nach der Methode von MACHATA (66) sehr rasch durchzuführen.

Tabelle 11 : Retentionszeiten und -indices der untersuchten Substanzen  
auf den stationären Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000

| Säulenfüllmaterial                        |                 | 3% SP2100 DB        |      | 3% OV225            |      | 1% SP1000           |      |
|-------------------------------------------|-----------------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
| Säulentemperatur; Trärgas (He) - Strömung |                 | 200°C; 20ml/min     |      | 220°C; 20ml/min     |      | 200°C; 20ml/min     |      |
| Totzeit t <sub>m</sub>                    |                 | 0,17min             |      | 0,11min             |      | 0,15min             |      |
| INN                                       | Handelsname     | Brutto-<br>Ret.zeit | RI   | Brutto-<br>Ret.zeit | RI   | Brutto-<br>Ret.zeit | RI   |
| Metipranolol                              | Disorat         | 6,02                | 2255 | 8,95                | 3114 | 12,27               | 3148 |
| Metoprolol                                | Beloc, Lopresor | 2,99                | 2051 | 3,66                | 2794 | 5,10                | 2871 |
| Nifenalol                                 | Beta-Intensain  | 2,15                | 1953 | 4,30                | 2852 | 5,53                | 2897 |
| Oxprenolol                                | Trasicor        | 2,02                | 1934 | 2,29                | 2624 | 2,92                | 2691 |
| Toliprolol                                | Doberol         | 1,10                | 1745 | 1,15                | 2366 | 1,36                | 2435 |
| Tripelenamin                              | Pyribenzamin    | 2,28                | 1971 | 2,13                | 2597 | 2,39                | 2625 |
| Bunitrolol                                | Stresson        | 2,42                | 1989 | 4,93                | 2901 | 6,03                | 2924 |
| <hr/>                                     |                 |                     |      |                     |      |                     |      |
| C <sub>2</sub> -Schritte                  | C <sub>16</sub> | 0,73                | 1600 | -                   | -    | -                   | -    |
|                                           | C <sub>18</sub> | 1,31                | 1800 | -                   | -    | -                   | -    |
|                                           | C <sub>20</sub> | 2,51                | 2000 | -                   | -    | -                   | -    |
|                                           | C <sub>22</sub> | 4,97                | 2200 | 0,75                | 2200 | -                   | -    |
|                                           | C <sub>24</sub> | 10,00               | 2400 | 1,26                | 2400 | 1,23                | 2400 |
| C <sub>4</sub> -Schritte                  | C <sub>28</sub> | -                   | -    | 3,72                | 2800 | 4,08                | 2800 |
|                                           | C <sub>32</sub> | -                   | -    | 11,42               | 3200 | 14,46               | 3200 |
|                                           | C <sub>36</sub> | -                   | -    | 35,50               | 3600 | 49,60               | 3600 |
|                                           |                 |                     |      |                     |      |                     |      |

#### 4.7. Identifizierung und quantitativer Nachweis von Metoprolol anhand eines authentischen Patientenurins

Die quantitative Bestimmung von Beta-Blockern im Urin konnte bereits im Rahmen dieser Arbeit zur Klärung eines juristischen Sachverhalts eingesetzt werden.

Dabei handelte es sich um einen Autofahrer, der wegen Verdacht auf Trunkenheit am Steuer von der Polizei zur Blutentnahme vorgeführt wurde. Er gab unter anderem zu Protokoll, am Morgen dieses Tages eine Tablette Beloc<sup>R</sup> (100mg) eingenommen zu haben. Da Beta-Blocker zwar nicht die Blutalkoholkonzentration beeinflussen, jedoch besonders in Verbindung mit Alkohol die Verkehrstauglichkeit herabsetzen können, wurde zusätzlich eine Urinprobe sichergestellt.

##### 4.7.1. Arbeitsbedingungen

Die allgemeinen gaschromatographischen Bedingungen sind unter Punkt 4.2.2. zu entnehmen. Verwendung fand die Säulenpackung 3% SP2100 DB. Für die physiologisch geringen Konzentrationen, wie sie nach therapeutischer Dosierung im Urin vorliegen, war wieder der NP-FID erforderlich. Als interner Standard diente das Tripelelenamin.

##### 4.7.2. Arbeitsmethode

Analog Arbeitsvorschrift VII wurde Arbeitsvorschrift VIII entwickelt. Der Extrakt wurde eingedampft und in 50 µl Äthanol wiederaufgenommen, wovon 3 µl gaschromatographisch analysiert wurden. Das so erhaltene Chromatogramm (s. Abb. 10) zeigte neben dem Peak des internen Standards Tripelenamin mit einer Bruttoretentionszeit von 2,28 min einen weiteren mit einer in beiden Chromatogrammen der Doppelbestimmung identischen Bruttoretentionszeit von 2,94 min. Nach den unter Punkt 4.6. vorgestellten Formeln ergibt sich für die unbekannte Substanz ein RI von 2047. Dieser Wert liegt

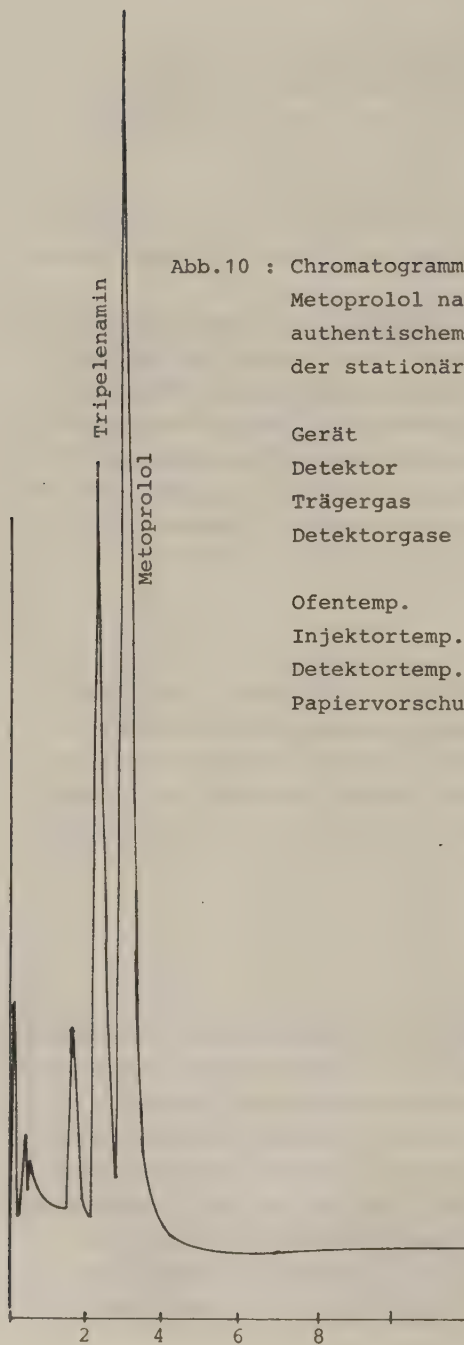


Abb.10 : Chromatogramm des Beta-Blockers  
Metoprolol nach Extraktion aus  
authentischem Patientenurin auf  
der stationären Phase 3% SP2100 DB

|                |                            |
|----------------|----------------------------|
| Gerät          | HP 5830 A                  |
| Detektor       | NP-FID, Spannung 20V       |
| Trägergas      | He (20 ml/min)             |
| Detektorgase   | H <sub>2</sub> (4,5ml/min) |
|                | Luft (60 ml/min)           |
| Ofentemp.      | 200°C                      |
| Injektortemp.  | 250°C                      |
| Detektortemp.  | 300°C                      |
| Papiervorschub | 0,5 cm/min                 |

um 4 RI-Einheiten niedriger als der in Tabelle 11 aufgelistete Wert für Metoprolol. Damit kann, im Hinblick auf die von BERNINGER et al. (15) angegebene Schwankung von 4 RI-Einheiten, die Identität dieses Peaks mit Metoprolol angenommen werden.

Der Quotient 'y' aus Peakhöhe des Beta-Blockers zu Peakhöhe des Standards ergibt als Mittelwert der Doppelbestimmung 1,619. Mit der Umkehrfunktion ' $x = A_2 + B_2 y$ ' aus Punkt 4.5. und den Werten  $A_2$  und  $B_2$  für Metoprolol aus Tabelle 10 kann nun die ursprüngliche Konzentration des Metoprolol im Patientenurin zu 1,85 µg/ml errechnet werden.

Die physiologischen Konzentrationen von Beta-Blockern bei einer Dosierung von 10mg/6h liegen nach Angaben der Literatur im Urin bei 6-12 µg/ml. Nachdem bei dem vorliegenden Fall eine Dosierung von 1x100mg/d entsprechend 25mg/6h bestand, und für unmetabolisiertes Metoprolol eine Ausscheidungs menge von ca. 3% der Dosis angegeben wird, kann die gefundene Konzentration von 1,85 µg/ml Urin durchaus als physiologisch angesehen werden.

Damit konnte Metoprolol nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.

#### 4.7.3. Nachweisgrenzen

Der Beta-Blocker Metoprolol mit einer Extraktionsausbeute von 23,9% und einer Reinsubstanzausscheidung von etwa 3% der applizierten Dosis erschien im Chromatogramm dieser speziellen Untersuchung mit der 1,6 - fachen Peakhöhe des inneren Standards und war damit ohne Schwierigkeiten zu identifizieren. Die Nachweisgrenze liegt nach den Ergebnissen der Eichgeraden unter Punkt 4.5. bei Konzentrationen von 0,1 µg/ml Urin.

Bei ausschließlicher Verwendung des  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffersystems kann die Nachweisgrenze auf 0,05 µg/ml Urin gesenkt werden.

Die Nachweisgrenzen der anderen untersuchten Beta-Blocker dürften entsprechend ihrer N-Äquivalente, Extraktionsausbeuten und Reinsubstanzausscheidung in etwa derselben Größenordnung liegen.

#### 4.8. Arbeitsvorschriften

##### I Derivatisierung und Nachderivatisierung von Beta-Blockern mit Propionsäureanhydrid (PSA) und Pyridin

100µl einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der Konzentration 1mg/ml werden mit 0,9ml wässriger gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 1,0ml PSA/Äthylacetat (2:98) vermenget. Dies wird 2min lang mit einem automatischen Schüttler gemischt und anschließend bei 3000U/min zentrifugiert. Die organische Phase wird abgenommen und nach dem Einengen in 50µl konzentrierter PSA und 50µl Pyridin gelöst. Dies wird 1h bei 80°C unter Luftabschluß im Wasserbad erhitzt und zuletzt eingengt. Der Rückstand wird zur GC-Analyse in 1ml Äthylacetat aufgenommen.

Für die Arbeitsvorschriften II-VII stand pharmakafreier Normalurin zur Verfügung, der aus Gründen der Konservierung mit 1nHCl auf pH3 eingestellt wurde.

##### II Extraktion mit AMBERLITE XAD-2- Austauscherharzsäulen

Zu 20ml Urin werden je 0,2ml wässriger Beta-Blocker- und Triphenamin-Lösung der Konzentration von je 1mg/ml gegeben, mit einigen Tropfen konz. Ammoniaklösung auf etwa pH9,5 gebracht und dazu 4ml  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer zur exakten Einstellung des pH9,5 zugefügt. Dieses Gemisch wird auf die XAD-2-Säulen gegeben und anschließend mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe gänzlich abgesaugt. Nun werden die vorher in der Säule festgehaltenen Substanzen mit 3x5ml des Elutionsmittels Äthylacetat/1,2-Dichloräthan (6:4) in Auffanggefäße gespült. Das Eluat wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe zur Trockne eingengt. Anschließend wird der Rückstand in 2ml n-Propanol aufgenommen und der gaschromatographischen Untersuchung zugeführt.

### III Extraktion mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1)

Zu 5,0 ml Urin werden je 50  $\mu$ l wässriger Beta-Blocker- und Tripe-  
lenamin-Lösung der Konzentration von je 1 mg/ml, einige Tropfen  
konz. Ammoniaklösung für einen pH von etwa 9,5 und 1 ml  $\text{NaHCO}_3$ /  
 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer zur exakten Einstellung des pH 9,5 zugegeben. Dazu  
werden 2 ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt)/  
2-Methylbutanol(1) (95:5) gefügt. Diese Mischung wird 30 sec auto-  
matisch geschüttelt und 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Über-  
stand wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe eingeeengt und zur  
gaschromatographischen Untersuchung in 0,5 ml Äthanol gelöst.

### IV Ausbeuteoptimierung mit Änderung der Extraktions- mittelmischung

Zu 5 ml Urin werden 50  $\mu$ l einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der  
Konzentration 100  $\mu$ g/ml gefügt. Um einen pH von etwa 9,5 zu errei-  
chen, gibt man einige Tropfen konz. Ammoniaklösung, und zur glas-  
elektrodengeprüften Einstellung des pH 9,5 1 ml  $\text{NaHCO}_3$ / $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puf-  
fer hinzu. Darauf wird das Extraktionsmittel Petroleumbenzin/2-Me-  
thylbutanol(1) in den Mischungen 80:20, 70:30 bzw. 60:40 zu jeweils  
2 ml gebracht. Weiterhin wird analog Arbeitsvorschrift III verfahren.  
Den 0,5 ml Äthanol werden jedoch noch vor der gaschromatographi-  
schen Analyse 50  $\mu$ l einer wässrigen Tripelenamin- bzw. Beta-Blocker-  
standard-Lösung der Konzentration 10 bzw. 100  $\mu$ g/ml beigemischt.

### V Ausbeuteoptimierung mit Änderung der pH-Werte des Urins

Zu 5 ml Urin werden 50  $\mu$ l einer wässrigen Beta-Blocker-Lösung der  
Konzentration 100  $\mu$ g/ml gefügt. Um einen pH von etwa 9,5 zu errei-  
chen, werden einige Tropfen konz. Ammoniaklösung beigemischt. Unter  
Glaselektrodenkontrolle werden mit  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ -Puffer und einigen  
Tropfen konz. Ammoniak- bzw. 1 n Salzsäure-Lösung die pH-Werte 8,5,  
9,5 und 10,5 exakt eingestellt. Darauf werden 2 ml des Extraktions-  
mittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) (70:30) geschichtet.  
Weiterhin wird wie in Arbeitsvorschrift IV verfahren.

# VI Mischungen der nichtextrahierten Substanzen zur Bestimmung der Ausbeute

Es werden in 450µl Äthanol 50µl einer äthanolischen Beta-Blocker-Lösung der Konzentration 100µg/ml und 50µl einer äthanolischen Tripelenaminlösung der Konzentration 10µg/ml bzw. einer Beta-Blockerstandard-Lösung der Konzentration 100µg/ml gelöst und der gaschromatographischen Trennung unterzogen.

# VII Extraktionen mit Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) zur Bestimmung der Eichgeraden

|                                                                                                       |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Für die Konzentrationen                                                                               | 0,1 ,0,3 ,0,5 ,1,0 und 2,0µg/ml |
| wurden von Normalurin                                                                                 | 4,95,4,85,4,75,4,5 und 4,0 ml,  |
| von wässr.Beta-Blocker-Lösungen                                                                       |                                 |
| der Konzentration 10µg/ml                                                                             | 50, 150, 250,500 und 1000µl     |
| und von Tripelenamin- bzw. Beta-Blockerstandard-Lösungen der Konzentration 100µg/ml je 50µl gemischt. |                                 |

Dazu werden für ungefähren pH9,5 einige Tropfen konz. Ammoniaklösung und für glaselektrodengeprüften pH9,5 1ml NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer gegeben.Darüber werden 2ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) geschichtet.Anschließend wird 30sec automatisch geschüttelt und 5min bei 3000U/min zentrifugiert.Der Überstand wird bei 80°C mit einer Wasserstrahlpumpe eingeengt und in 50µl Äthanol aufgelöst.Davon werden etwa 2-3µl gaschromatographisch untersucht.

# VIII Extraktion von Beta-Blockern aus authentischen Urinen

Zu 5ml Patientenurin (physiologischer pH) werden 50µl einer Tripelenamin- bzw. Beta-Blockerstandard-Lösung der Konzentration 100µg/ml,einige Tropfen konz. Ammoniaklösung bis ca.pH9,5 und 1ml NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer für glaselektrodengeprüften pH9,5 gegeben. Darüber schichtet man 2ml des Extraktionsmittels Petroleumbenzin/2-Methylbutanol(1) (70:30) und verfährt weiterhin analog Arbeitsvorschrift VII.

## 5. DISKUSSION

Aufgabe dieser Arbeit war es, ein labortechnisch günstiges und selektives Nachweisverfahren zu entwickeln, mit dem ein größeres Spektrum an Beta-Blockern erfaßt werden kann.

Die in der vorliegenden Studie erarbeitete Methode beruht auf der Lösungsmittlextraktion und dem gaschromatographischen Nachweis im Urin enthaltener unmetabolisierter Beta-Adrenolytika.

Mit dem Extraktionsmittel Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt) / 2-Methylbutanol (1) wurde eine sehr hohe Selektivität für die Extraktion von Beta-Blockern erreicht. Mit einer für gaschromatographische Bedingungen hinreichenden Ausbeute wird der quantitative Nachweis von Beta-Blockern selbst nach therapeutischer Dosierung möglich.

Da eine auf den Durchschnitt optimierte Methode erarbeitet werden sollte, mußten bezüglich der Ausbeute bei einigen Beta-Blockern Einbußen hingenommen werden. Wie aus den Untersuchungen unter Punkt 4.4.4. hervorgeht, wäre bei ausschließlicher Verwendung des Ammoniakpuffersystems die Ausbeute durchschnittlich etwa um den Faktor drei zu steigern. Da der Extraktionsmittelüberstand von 2 ml nach der endgültigen Arbeitsvorschrift VIII zur Trockne eingengt und in nur 50 µl Äthanol aufgelöst wird, gewinnt man allein dadurch einen Konzentrierungsfaktor für Beta-Blocker von etwa 40. Durch die hohe Selektivität der vorgestellten Methode für Beta-Blocker werden jedoch kaum Begleitsubstanzen mitextrahiert, sodaß selbst bei einem Konzentrierungsfaktor von 40 nur sehr geringe Störsignale bei der gaschromatographischen Analyse auftreten. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens unter Verwendung des Natriumhydrogencarbonatpuffers genügt im allgemeinen für Beta-Blocker-Konzentrationen nach therapeutischer Dosierung, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf den ausschließlichen Gebrauch des Ammoniakpuffers verzichtet wurde. Wegen der extrem hohen Ausbeutedifferenz bei Toliprolol bezüglich der beiden Puffer ist aber bei Urinextraktionen zum Nachweis dieses Beta-Blockers das Ammoniak- dem Natriumhydrogencarbonatsystem vorzuziehen.

Dadurch, daß nur unmetabolisierte Beta-Blocker nachgewiesen werden, entfällt eine Hydrolyse der im Urin in höherem Prozentsatz ent-

haltenen Glucuronsäureester der Beta-Blocker. Für einige Beta-Adrenolytika fanden sich in der Literatur keine Untersuchungen über die prozentuale renale Ausscheidung ihrer Reinsubstanzen. Falls künftige Stoffwechselstudien für diese Beta-Blocker eine Ausscheidungsrate an unmetabolisierter Substanz von weit weniger als 1% der Dosis erbringen sollten, und deshalb mit dem vorgestellten Verfahren unmittelbar keine Resultate zu erzielen sind, ist die zusätzliche Hydrolyse der Glucuronsäureester der Beta-Blocker im Urin analog DAVIS et al. (30) und WEIL-MALHERBE (114) zu empfehlen. Zum qualitativen Nachweis eines zu analysierenden Beta-Blockers mit Hilfe der Retentionsindices nach KOVATS (60) genügt es im allgemeinen, den RI des interessierenden Stoffs auf nur einer Säule zu bestimmen, sofern die Retentionszeiten weiterer eventuell verabreichter Medikamente auf dieser Säule bekannt und genügend weit von der Retentionszeit des Beta-Blockers entfernt sind.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die in der Literatur beschriebenen Stoffwechselvorgänge und Analyseverfahren zusammengestellt, die jedoch meist nur dem Nachweis einer einzigen Substanz gelten und oft einen relativ hohen labortechnischen Aufwand erfordern. Deshalb war es Ziel dieser Studie, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem möglichst schnell und einfach ein größeres Spektrum an Beta-Blockern nach therapeutischer Dosierung sowohl qualitativ wie auch quantitativ erfaßt werden kann. In diesem Zusammenhang sei die Dissertation von RIEDL (91) erwähnt, in der weitere fünf Beta-Blocker in analoger Weise bearbeitet wurden.

Es wurde die Brauchbarkeit der Dünnschichtchromatographie untersucht, die jedoch zu geringer Spezifität erbrachte und für Pharmakonzentrationen nach therapeutischer Dosierung viel zu unempfindlich war.

Deshalb wurde eine gaschromatographische Nachweismethode unter Verwendung eines hoch stickstoffempfindlichen NP-FID entwickelt. Von sechs untersuchten Säulenfüllmaterialien erwiesen sich die stationären Phasen 3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 als günstig. Dabei brachte die isotherme Ofentemperatur von 200°C bzw. 220°C gute Ergebnisse.

Die Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid zeigte nur bei einigen ohnehin ungünstigen Säulenfüllmaterialien nennenswerte Verbesserungen der Peakformen, sodaß unter dem Aspekt der Vermeidung eines Mehraufwandes darauf verzichtet wurde.

Die Extraktionsmethode mit dem AMBERLITE XAD-2- Austauscherharzsystem ergab einen zu hohen Prozentsatz an störenden mitextrahierten Begleitsubstanzen, sodaß ein Ausschüttelverfahren mit einer eigenen Petroleumbenzin (40°C Siedepunkt)/2-Methylbutanol (1)-Mischung von 70:30 Volumenanteilen bei einem mit Natriumhydrogencarbonatpuffer eingestellten pH 9,5 des Urins entwickelt wurde. Diese Methode ist auf den Durchschnitt der Beta-Blocker optimiert und zeichnet sich durch zufriedenstellende Ausbeuten und hohe Selektivität aus.

Die Identifizierung der Beta-Adrenolytika wurde durch Anwendung des RI-Systems von KOVATS (60) auf den stationären Phasen

3% SP2100 DB, 3% OV225 und 1% SP1000 ermöglicht.

Anhand eines authentischen Patientenurins wurde die Praktikabilität dieses Verfahrens durch qualitativen und quantitativen Nachweis des Beta-Blockers Metoprolol demonstriert.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Åblad, B., Borg, K.O., Carlsson, E., Ek, L., Johnsson, G., Malmfors, T. und Regårdh, C.-G., Acta Pharmacol.Toxicol. 36, 7-23 (1975)
2. Ånggård, E. und Sedvall, G., Analyt.Chem. 41, 1250-1256 (1969)
3. Ahlquist, R.P., Amer.J.Physiol. 153, 586 (1948)
4. Ahlquist, R.P., J.Pharm.Sci. 55, 369 (1966)
5. Ahlquist, R.P. und Levy, B., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 172, 146 (1959)
6. Alber, L.L., J.A.O.A.C. 52, 1295 (1969)
7. Alcock, S.J. und Bond, P.A., Proc.Eur.Soc.Study Drug Toxicol 4, 30 (1965)
8. Arndts, D. und Pollmann, W., Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 277, 349-362 (1973)
9. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Arzneiverordnung in der Praxis 7, (1977)
10. Aue, W.A., Gehrke, C.W., Tindle, Q.C., Stalling, W.L. und Ruyle, C.D., J.Gas Chromatogr. 5, 381 (1967)
11. Auterhoff, H., Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Stuttgart 1974
12. Auterhoff, H. und Kovar, K.A., Identifizierung von Arzneistoffen, 2.Aufl., Wissenschaftl.Verlags GmbH, Stuttgart 1973
13. Auterhoff, H. und Stanke, R., Dtsch.Apotheker Ztg. 116, 1596-1597 (1976)
14. Bergmann, J.F., Verhand.der Dtsch.Gesellsch.für innere Med. (Sonderdruck) 76, 925-927 (1970)
15. Berninger, H., Grünagel, R., Mall, S., Möller, M.R., Beitr.gerichtl. Med. 33, 185 (1975)
16. Berninger, H. und Möller, M.R., Arch.Toxicol. 37, 295-305 (1977)
17. Black, J.W. und Prichard, B.W.C., Brit.Med.Bull. 29, 163-167 (1972)
18. Bodin, N.-O., Borg, H.O., Johansson, R., Ramsay, C.-H. und Skånberg, I., Acta Pharmacol.Toxicol. 36, 116-124 (1975)
19. Boehringer Sohn, C.H., Doberol<sup>R</sup>, 4, Ingelheim 1977
20. Borg, K.O., Carlsson, E., Hoffmann, K.-J., Jönsson, T.-E., Thorin, H. und Wallin, B., Acta Pharmacol.Toxicol. 36, 125-135 (1975)

21. Braun,P.,Friedel,D.,Klaus,W.,Kockelke,W. und Reker,K.,  
Unfall- und Sicherheitsforschung Straßenverkehr 16,  
395-403 (1978)
22. Brooks,C.J.W. und Horning,E.C., Analyt.Chem. 36,1540-1545  
(1964)
23. Brunner,L.,Imhof,P. und Jack,D., Eur.J.Clin.Pharmacol. 8,  
3-9 (1975)
24. Butts,W.C., Analyt.Biochem. 46,187-199 (1972)
25. Caddy,B.,Fish,F. und Scott,D., Chromatographia 6,293-300  
(1973)
26. Chundela,B., persönliche Mitteilung,Prag 1968
27. Clarke,E.G.C., Isolation and Identification of Drugs,  
The Pharmaceutical Press,London 1969
28. Clarke,D.D.,Wilk,S. und Gitlow,S.E., J.Gas Chromatogr. 4,  
310 (1966)
29. Cuypers,J., Dissertation Heidelberg 1971
30. Davis,V.E.,Huff,J.A. und Brown,H., J.Lab.Clin.Med. 66,  
390-402 (1965)
31. Dill,W.A. und Glazko,A.J., J.Biol.Chem. 179,395 (1949)
32. Drew,A.O. und Leech,S., Toxicol.Abstr. 1,154-X1 (1978)
33. El Gendi,S.,Kisser,W. und Machata,G., Mikrochem.Acta 120(120)
34. Erhart,G. und Ruschig,H., Arzneimittel,Bd.2,2.Aufl.,178-180,  
Verlag Chemie,Weinheim 1972
35. Ervik,M., Acta Pharmaceut.Suecica 6,393-400 (1969)
36. Ervik,M., Acta Pharmacol.Toxicol. 36,suppl.V,136-144 (1975)
37. Evans,G.H.,Nies,A.S. und Shand,D.G., J.Pharmacol.Exptl.  
Therapeut. 186,114-122 (1973)
38. Fike,W.W., Analyt.Chem. 38,1697 (1966)
39. Forth,W.,Henschler,D. und Rummel,W., Allgemeine und speziel-  
le Pharmakologie und Toxikologie,2.überarb.Aufl.,122-126,  
BI-Wissenschaftsverlag,Mannheim-Wien-Zürich 1977
40. Gault,R.,Monforte,J.R. und Khasnabis,S., Clin.Toxicol. 11,  
295-299 (1977)
41. Gibaldi,M.,Boyes,R.N. und Feldman,S., J.Pharm.Sci. 60,  
1338-1340 (1971)
42. Gillette,J.R., Pharmacol.Pharmacokin.,Fogarty International  
Center Proceedings No.20,209-231,Plenum Press 1974
43. Giuliani Pharma GmbH,Sinorytma<sup>R</sup>,7-8,Hannover 1977

44. Goenechea, S., J.Chromatogr. 36, 375 (1968)
45. Goldman, V., Comerford, R., Hughes, A. und Nyberg, S., Nature 224, 1175-1178 (1969)
46. Goodman, L.S. und Gilman, A., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5.Aufl., 547-560, Macmillan New York 1975
47. Howe, R. und Shanks, R.G., Nature 210, 1336 (1966)
48. Hupe, K.P., J.Gas Chromatogr. 3, 12 (1965)
49. ICI, Stephenson, J.S., Brit.Pat. 909357 (1962)
50. Imhof, P., Die Bedeutung der Beta-I- und Beta-II-Selektivität und der intrinsischen sympathikomimetischen Aktivität von Beta-Blockern für die Hypertoniebehandlung, Vortrag Wien, 31.01.1975; zitiert in : Wiener klinische Wochenschrift (Sonderdruck), 88 (2), 68-71 (1976)
51. Jack, D.B. und Imhof, P., persönliche Mitteilung 1976
52. Jack, D.B. und Riess, W., J.Chromatogr. 88, 173-176 (1974)
53. Johansson, K.A., Appelgren, C., Borg, K.O. und Elofsson, R., Acta Pharmaceut.Suecica 11, 333-346 (1974)
54. Johnsson, G.G. und Regårdh, C.-G., Clin.Pharmacokin.1, 233-263 (1976)
55. Johnsson, G.G., Regårdh, C.-G. und Sölvell, L., Acta Pharmacol. Toxicol. 36, 31-44 (1975)
56. Kauert, G., Dissertation Bonn 1977
57. Kazyak, L. und Permisohn, R., J.Forens.Sci. 15, 346-353 (1970)
58. Kendall, M.J., Mitchard, M., West, M., John, V.A. und Ebbutt, A.F., Eur.J Drug Metabol.Pharmacokin.3, 155-160 (1976)
59. Koch-Weser, J. und Sellers, E.M., New England J.Med. 294, 526-531 (1976)
60. Kovats, E., Helv.Chim.Acta 41, 1915 (1958)
61. Küchlin, R., Dissertation Bonn 1971
62. Lilly, E., US.Pat. 2938921 (1960)
63. Levy, B., J.Pharmacol.Exptl.Therapeut. 127, 146 (1959)
64. Levy, B. und Wilkenfeld, B.E., Fedn.Proc.Fedn.Am.Socs.Exptl. Biol. 29, 1362-1364 (1970)
65. Macek, K. und Vecerkova, J., Pharmazie 20, 605 (1965)
66. Machata, G., Z.Rechtsmed. 79, 193-198 (1977)
67. Martin, Y.C. und Wiegand, R.G., J.Pharm.Sci. 59, 1313 (1970)
68. Mason, W.D. und Winer, N., Clin.Pharmacol.Therapeut. 20, 401-412 (1976)

69. McReynolds, W.O., Gas Chromatographic Data, Preston Techn. Abstracts Co., Evanston 1967
70. Meier, J., Acta Med. Scand. Suppl. 606, 65-70 (1977)
71. v. Meyer, L., Dissertation Erlangen-Nürnberg 1975
72. v. Meyer, L. und Hauck, G., Beitr. Gerichtl. Med. XXIX, 408 (1972)
73. Möllmann, H., Alfes, H., Schraven, E., Ostrowski, J., Nitz, R.-E. und Bigalke, C., Drug Res. 22, 1242-1250 (1972)
74. Möllmann, H., Schraven, E., Alfes, H. und Nitz, R.-E., Drug Res. 22, 487 (1972)
75. Möllmann, H., Schraven, E., Warntjen, H., Nitz, R.-E. und Alfes, H., Drug Res. 22, 492 (1972)
76. Moffat, A.C., J. Chromatogr. 113, 69-95 (1975)
77. Moran, N.C. und Perkins, M.E., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 124, 223 (1959)
78. Mulé, S.J., J. Chromatogr. 55, 255 (1971)
79. Mulé, S.J., Bastos, D., Jukofsky, D. und Saffer, E., J. Chromatogr. 63, 289 (1971)
80. Nambara, T., Akiyama, S. und Kurata, M., Yakugaku Zasshi 93, 439-441 (1973)
81. Ohio Valley Speciality Chemical, inc., Cat. 26, (1977/78)
82. Paget, G.E., Brit. Med. J. 11, 1266 (1963)
83. Peterson, M.L. und Hirsch, J., J. Lipid Res. 1, 132 (1959)
84. Pfeiffer, S. und Zimmer, C.H., Pharmazie 30, 625-633 (1975)
85. Pharmazeutische Stoffliste, Index Nominum (1978)
86. Powell, C.E. und Slater, J.H., J. Pharmacol. Exptl. Therapeut. 122, 480 (1958)
87. Quaglio, M.P. und Cavicchi, G.S., Edizione Pratica 11, (1975)
88. Regårdh, C.-G., Acta Pharmacol. Toxicol. 37, 3-39 (1975)
89. Regårdh, C.-G., Borg, K.O., Johansson, R., Johnsson, G. und Palmer, L., J. Pharmacokin. Biopharm. 2, 347-364 (1974)
90. Regårdh, C.-G., Johnsson, G., Jordö, L. und Sölvell, L., Acta Pharmacol. Toxicol. 36, 45-58 (1975)
91. Riedl, L., Dissertation München 1980
92. Riess, W., Huerzeler, H. und Raschdorf, F., Xenobiotica 4, 365-373 (1974)
93. Riess, W., Rajagopalan, T.G., Imhof, P., Schmid, K. und Keberle, K., Postgrad. Med. J. 32, (1970)
94. Rohrschneider, L., J. Chromatogr. 22, 6-22 (1966)

95. Schraven,E., Möllmann,H., Nitz,R.-E. und Alfes,H.,  
Drug Res. 22,479 (1972)
96. Schraven,E., Nitz,R.-E. und Klarwein,M.,  
Drug Res. 20,1905 (1970)
97. Shand,D.G., Drugs 7,39-47 (1974)
98. Stanke,R., Dissertation Tübingen 1976
99. Stock,K. und Westermann,E., Biochem.Pharmacol. 14,227-236  
(1965)
100. Supelco,inc.,Chromatography/Lipids,Bull. 723 B,Pennsylvania
101. Supelco,inc.,Chromatography/Lipids,Bull. 734,Pennsylvania  
1973
102. Supelco,inc.,Chromatography/Lipids,Bull. 755,Pennsylvania
103. Supelco,inc.,Chromatography Supplies,Cat.11,Pennsylvania  
1977
104. Taylor,S.H., Therapiewoche 25,4309-4312 (1975)
105. Taylor,S.H., Australian Family Physician 4,30-35 (1975)
106. Tindell,G.L.,Walle,T. und Gaffney,T.E., Life Sci. 11,  
1029-1036 (1972)
107. Vidic,E. und Schütte,J., Arch.Pharm. 295,342 (1962)
108. Walle,T., Acta Pharmaceut.Suecica 5,367-384 (1968)
109. Walle,T., J.Pharm.Sci. 12,1885-1891 (1974)
110. Walle,T. und Ehrsson,H., Acta Pharmaceut.Suecica 7,  
388-406 (1970)
111. Walle,T. und Ehrsson,H., Acta Pharmaceut.Suecica 8,27(1971)
112. Walle,T.,Morrison,J.I. und Tindell,G.L., Res.Comm.Chem.  
Pathol.Pharmacol. 1,1-8 (1974)
113. Walle,T.,Morrison,J.I.,Walle,K. und Conradi,E.,  
J.Chromatogr. 114,351-359 (1975)
114. Weil-Malherbe,H., Meth.Biochem.Anal. 16,293-326 (1967)
115. Wilk,S.,Gitlow,S.E.,Mendlowitz,M. und Clarke,D.D.,  
Fedn.Proc. 25,736 (1966)
116. Zarnak,J. und Pfeiffer,S., Pharmazie 19,216 (1964)

#### Nachtrag

117. Stahl,E., Dünnschichtchromatographie,2.Aufl.,  
Springer Verlag,Berlin-Heidelberg-New York 1967
118. Apha Academy of Pharmaceutical Sciences,Guidelines for  
Biopharmaceutical Studies in Man,Washington 1972

119. Walle,T.,Ishizaki,T. und Gaffney,T.E., J.Pharmacol.Exptl. Therapeut. 508,508-512 (1972)
120. Merck's Reagenzienverzeichnis,4.Aufl.,216,Springer-Verlag, Berlin 1916
121. Burgett,C.A.,Smith,D.H.,Bente,H.B.,Wirfel,J.C. und Goodhart,S.E., Application Note Hewlett Packard,2 (1976)

Lebenslauf

19.06.1954            Geboren in München

                      Vater : Georg Eberl, Oberstudiendirektor

                      Mutter: Theresia Eberl, geb. Appel

1960-1964            Besuch der Volksschule St.Max

                      in Augsburg

1964-1967            Besuch des humanistischen St.Anna

                      Gymnasium in Augsburg

1967-1971            Besuch des neusprachlichen Peutinger

                      Gymnasium in Augsburg

1971-1973            Besuch des neusprachlichen St.Marien

                      Gymnasium in Kaufbeuren

08.06.1973            Abitur in Kaufbeuren

WS 1973/74-           Studium der Anglistik und Geographie

WS 1974/75            an der Universität München

ab SS 1975            Studium der Zahnmedizin an der

                      Universität München

12.09.1975            Eheschließung mit Kollegen Ludwig Riedl

                      aus Rott am Inn

25.10.1976            Naturwissenschaftliche (zahnärztliche)

                      Vorprüfung in München

31.10.1977            Zahnärztliche Vorprüfung in München

ab Nov.1977           Doktorandin bei Prof. Dr. med. W. Spann

                      am Institut für Rechtsmedizin

                      der Universität München













